BIOLOGÍA CELULAR y MOLECULAR



Luis Felipe Jiménez
Horacio Merchant

Biología celular y molecular

Coordinadores:

Luis Felipe Jiménez García
Universidad Nacional Autónoma de México

Horacio Merchant Larios
Universidad Nacional Autónoma de México



MÉXICO • ARGENTINA • BRASIL • COLOMBIA • COSTA RICA • CHILE
ESPAÑA • GUATEMALA • PERÚ • PUERTO RICO • VENEZUELA

Datos de catalogación bibliográfica

JIMÉNEZ, L. FELIPE, MERCHANT, HORACIO

Biología celular y molecular

PEARSON EDUCACIÓN, México, 2003

ISBN: 970-26-0387-0
Área: Universitarios

Formato: 20 × 25.5 cm Páginas: 912

Editora: Leticia Gaona Figueroa
e-mail: leticia.gaona@pearsoned.com
Supervisor de desarrollo: Teresa Sanz Falcón
Supervisor de producción: José D. Hernández Garduño

PRIMERA EDICIÓN, 2003

Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana Reg. Núm. 1031

ISBN 970-26-0387-0

Impreso en México. *Printed in Mexico.*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 - 06 05 04 03



CONTENIDO

CAPÍTULO 5 GENES HOMEÓTICOS Y MECANISMOS MOLECULARES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR 103

PARTE II
Estructuras celulares

CAPÍTULO 6 LA MEMBRANA CELULAR 151

CAPÍTULO 9 EL CITOESQUELETO 273

CAPÍTULO 10 LAS MITOCONDRIAS 295

PARTE III
La célula y su microambiente

PARTE IV
Reproducción y muerte celular

PARTE VI
Biología celular y molecular de organismos modelo

PARTE VIII
El genoma humano

Prólogo

Biología celular y molecular lo escribió un extenso grupo de académicos que realizan labores de investigación, docencia y difusión en el área de la biología celular y molecular. La idea de escribirlo surgió de la necesidad real de poner al alcance de los estudiosos de habla hispana, una obra actualizada de los aspectos más importantes de la biología celular y molecular.

En 1995 durante la organización y desarrollo del "Sexto Congreso Iberoamericano de Biología Celular" nos percatamos de que en México hay un número importante de académicos e investigadores que trabajan directamente en el desarrollo de diferentes aspectos de la biología celular y molecular. Por ello, consideramos que era el momento de emprender una obra de esta magnitud en donde se ofreciera una nueva versión surgida de diferentes laboratorios. De hecho, la primera idea fue la de escribir tópicos selectos, en donde los autores hablaran sobre sus investigaciones, lo cual pronto nos llevó a escribir este libro que por su enfoque, contenido y actualidad resulta de importancia en diferentes niveles educativos.

La obra está organizada en 27 capítulos, que forman parte de ocho grandes temas que abarcan un panorama amplio de la biología celular y molecular. En el desarrollo de cada tema conservamos las versiones de cada capítulo lo más cercano posible a la propuesta original de cada equipo de autores; sin embargo, la obra es homogénea en su estructura.

La biología celular y molecular es una disciplina científica en pleno desarrollo en el mundo entero. El estudio de las estructuras celulares desde el punto de vista de sus constituyentes moleculares, en particular las moléculas de proteínas y ácidos nucleicos, ha sido una tendencia de la biología moderna, que ha permitido conocer el papel de cada organelo en el contexto de la regulación de la expresión genética.

En este libro se reúne un importante cúmulo de experiencias como resultado de muchos años de trabajo. También se abordan temas sobre la biología celular y molecular de algunos organismos cuyo estudio es de gran importancia para la salud humana como las amibas.

Un apoyo invaluable para la presente obra es su página de Internet elaborada con material aportado por varios colaboradores de la presente obra, así como otros profesores-investigadores y estudiantes. En ella se podrán ver además de las imágenes del libro, cuestionarios, animaciones y ligas a otros sitios Web que permitirán al lector ampliar la información expuesta en el libro y profundizar en los temas de su interés.

Estamos conscientes de que la vertiginosa generación de nuevos resultados científicos, creará la necesidad de agregar esos hallazgos e inclusive revisar algunos de los conceptos aquí expuestos en un tiempo razonable. Sin embargo, es claro también que la publicación de este primer libro, establece un punto de partida fundamental para que el lector hispano hablante cuente con un medio para el futuro seguimiento de los avances de mayor trascendencia en la biología celular y molecular moderna. Futuras versiones seguramente añadirán otros capítulos y autores que por el desarrollo de la presente obra no hemos tenido la oportunidad de contar con ellos.

Esperamos que el esfuerzo conjunto de todos los autores para ofrecer este libro contribuya a un mejor conocimiento de la célula viva.

Luis Felipe Jiménez García
Horacio Merchant Larios
coordinadores

AGRADECIMIENTOS



Capítulo 2

El autor agradece a Luis Roberto Reveles Torres y Alejandro Alvarado Gutiérrez, estudiantes de la Maestría en Biología Experimental, U.B.E.-U.A.Z., por su apoyo en la realización de las figuras que se incluyen en este capítulo. Al CONACyT, por el apoyo otorgado al autor con el Proyecto Ref. 3786M.



Capítulo 4

Este trabajo fue apoyado parcialmente por los donativos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (IN203200) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-CONACYT (33863-N).



Capítulo 12

Los autores agradecen la eficaz colaboración de Porfirio Munguía Reyes y Ernestina Ubaldo por la elaboración de los esquemas y fotografías.



Capítulo 18

Este trabajo fue apoyado por los donativos de CONACyT 0268P-N9506 (G. Cassab) y DGAPA IN204496 (A. A. Covarrubias/G. Cassab). Se agradece la colaboración en la elaboración de las figuras a la Bióloga Claudia Mergold-Villaseñor.



Capítulo 21

El autor desea agradecer sinceramente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, así como a la Fundación Miguel Alemán, por el apoyo a sus investigaciones. Asimismo, desea agradecer a todos los miembros de su laboratorio y colegas que de alguna manera contribuyeron con sus análisis a mejorar este capítulo.



Capítulo 23

En este capítulo agradecemos la valiosa colaboración del Sr. José G. Baltazar por el apoyo técnico y al Sr. Jorge Hernández por el excelente trabajo fotográfico. Este trabajo se realizó con apoyo parcial de la DGAPA (IN204598).



Otros agradecimientos

De igual manera queremos agradecer a:

Dr. José Luis Gómez Olivares, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.
Dra. Susana Moreno Díaz de la Espina, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España, por sus comentarios generales a la obra que permitieron su enriquecimiento.

Y hacemos un agradecimiento especial por su invaluable colaboración en la elaboración de los cuestionarios y animaciones de la página Web a:

Cuestionarios
M. en C. Martha Ofelia Salcedo Álvarez, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
M. en C. Sergio González Moreno, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
M. en C. Hugo V. Perales Vela, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
Biól. José del Carmen Benítez Flores, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Animaciones
Dra. María Larios.
Dra. María de Lourdes Segura Valdez, Facultad de Ciencias, UNAM.
Citlali Vázquez Echeverría, estudiante, Facultad de Ciencias, UNAM.
Abraham Hernández Hernández, estudiante, Facultad de Ciencias, UNAM.
Rodrigo Rojas Ávalos, estudiante, Facultad de Ciencias, UNAM.

ACERCA DE LOS AUTORES

M. en C. Abigail Betanzos Fernández

Es estudiante de doctorado del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, en donde realiza un proyecto sobre la expresión diferencial de las isoformas de la proteína ZO-1 e interacción de ZO-2 con factores de transcripción. Ha publicado en revistas como *Experimental Cell Research, Seminars in Cell & Developmental Biology, Biochemical Journal, Progress in Biophysics* y *Molecular Biology*.

Dr. Adolfo Martínez Palomo

Médico y doctor en ciencias de la UNAM. Realizó estudios de posgrado sobre el cáncer en París. Es miembro del Colegio Nacional y de la Academia Mexicana de Ciencias, de la que también fue presidente. Actualmente es director general del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Es miembro de la Comisión Internacional de Investigación en Salud de la Universidad de Harvard, miembro de la Comisión de Expertos del Programa de Enfermedades Parasitarias de la Organización Mundial de la Salud, miembro de la Junta Directiva de la Fundación México-Estados Unidos para la Ciencia, fue presidente de la Academia Nacional de Medicina. Obtuvo el Premio Nacional de Ciencias, el Premio Internacional de Biología de la Academia de Ciencias del Tercer Mundo y la Condecoración Eduardo Liceaga, entre otros. Fue investigador en el Instituto Nacional de Cardiología. Cuenta con más de 100 publicaciones científicas, una de las cuales está considerada como una cita clásica en el tema de cubierta de membrana. Se le considera experto mundial en enfermedades infecciosas, en especial de la amibiasis.

Alejandra Covarrubias Robles

Obtuvo el doctorado en la UNAM, en donde actualmente es investigadora del Instituto de Biotecnología. Pertenece a la Academia Mexicana de Ciencias y ha sido becaria de la Fundación Rockefeller. Su trabajo trata sobre el estudio de la respuesta de las plantas superiores a estrés ambiental y los mecanismos de respuesta a estrés osmótico en levadura. Ha publicado en revistas especializadas como *Plant Physiology, Yeast, Plant and Cell Physiology, Journal of Biological Chemistry, The Plant Journal, Plant Molecular Biology, European Journal of Plant Pathology*.

Dr. Alejandro García Carrancá

Investigador del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Desarrolla proyectos de investigación sobre los mecanismos moleculares del cáncer en el ser humano.

Dr. Alfonso González Noriega

Biólogo con doctorado en la Universidad de Washington. Es investigador en el Laboratorio de Enzimas Lisosomales del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en donde ha sido jefe de sección de la Unidad de Genética de la Nutrición. Es miembro numerario de la Society for Inherited Metabolic Disorders, de la Asociación Mexicana de Genética Humana, y fundador en 1985 de la Sociedad Mexicana de Biología Celular. Obtuvo el Premio Eduardo Liceaga de la Academia Nacional de Medicina en 1981 y el Premio Reina Sofía en España en 2001. Ha publicado en revistas como *Journal of Cell Biology* y *Journal of Biological Chemistry*.

Dra. Alicia Gamboa de Buen

Obtuvo el grado de doctora en la UNAM. Actualmente es investigadora del Instituto de Ecología de la UNAM, investigando sobre los mecanismos moleculares del desarrollo de las plantas.

Dra. Annie Pardo Semo

Es doctora en Bioquímica. Actualmente es profesora de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Es coordinadora del Consejo Académico del Área de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UNAM.

Es investigadora nacional. Su línea de trabajo versa sobre la remodelación de la matriz extracelular en condiciones fisiológicas y patológicas, área en la que ha publicado mas de 70 artículos de investigación y 7 capítulos de libros. Recibió Mención Honorífica en el Premio Internacional Latinoamericano en Neumología, "Fernando D. Gómez", de la Unión Latinoamericana de Sociedades de Tisiología y Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Obtuvo el Premio Anual de Investigación "Fundación Glaxo", 1992 y 1995 y el Premio CANIFARMA en investigación básica en 2001.

Dra. Antonia Ávila Flores

Obtuvo el doctorado en Ciencias en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Realizó una estancia de investigación en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Madrid, España. Ha publicado en revistas como *Molecular and Cellular Biology, Biochemical Journal, Seminars in Cell & Developmental Biology*, y *Journal of Cell Science*.

Dr. Antonio Lazcano Araujo Reyes

Antonio Lazcano Araujo obtuvo el título de biólogo y el doctorado en ciencias en la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde actualmente coordina el grupo de origen de la vida. Es autor de varios libros, incluidos "El Origen de la Vida", "La Bacteria Prodigiosa", y "La Chispa de la Vida", y a coeditado más de 12 volúmenes especializados, dedicados a examinar el origen y la evolución temprana de la vida. Autor de más de cien trabajos de investigación, ha sido profesor invitado en Cuba, España, la URSS, Francia, Suiza y EE.UU. Es miembro de varios comités editoriales de revistas de investigación internacionales, investigador nacional y actualmente presidente de la International Society for the Study of the Origins of Life.

Dr. Armando Gómez Puyou

Investigador emérito del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM e investigador nacional emérito. Su investigación versa sobre el papel del solvente en la estabilidad y catálisis de las enzimas, los mecanismos de la síntesis de ATP por la ATP sintetasa y el diseño de especies de inhibidores específicos de acción enzimática.

Dr. Arturo Becerra Bracho

Actualmente trabaja en la Facultad de Ciencias de la UNAM, en donde desarrolla investigación y enseñanza en el tema de origen de la vida. Obtuvo su doctorado en la UNAM.

Dr. Arturo González Robles

Actualmente realiza investigación en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Su trabajo de investigación se centra en el conocimiento ultraestructural de parásitos unicelulares del ser humano.

Dr. Arturo Ponce

Investigador del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Su trabajo se centra en el estudio de la biología celular de las membranas biológicas.

Dra. Carmen Gómez Eichelman

Investigadora del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en donde realiza estudios sobre el superenrollamiento del DNA, las topoisomerasas (girasas) y el estrés celular, y sobre la fluidez de membrana y el estrés por calor.

Dra. Caroline Burgeff

Actualmente realiza estudios de posdoctorado en Europa. Obtuvo el grado de doctora en la UNAM realizando estudios sobre el desarrollo de la raíz.

Dr. Edmundo Bonilla González

Es biólogo de la UNAM y obtuvo el doctorado en la Universidad Autónoma de Madrid. Actualmente es profesor de la Universidad Autónoma Metropolitana, realizando labores de investigación sobre reproducción. Sus trabajos han sido publicados en revistas como *Zygote* y *Bioquimia*.

M. en C. Eduardo Casas Hernández

Maestro en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana. Actualmente es profesor de la misma universidad. Su trabajo versa sobre la fertilización en mamíferos y la maduración *in vitro* de ovocitos. Fue coordinador de la Licenciatura en Biología Experimental de la UAM. Ha publicado sus trabajos científicos en revistas como *Advances in Contraceptive Delivery Systems, Zygote, Bioquimia.*

Dra. Elena Álvarez Buylla Roces

Es bióloga y maestra en ciencias de la UNAM. Realizó estudios de doctorado en la Universidad de Berkeley en Estados Unidos. Actualmente desarrolla investigación en el Instituto de Ecología de la UNAM. Obtuvo la Distinción Universidad Nacional y el Premio de la Academia Mexicana de Ciencias en Investigación. Su trabajo actual trata del papel de los genes homeóticos en el desarrollo de la raíz.

Dra. Estela Sánchez Quintanar

Obtuvo el doctorado en Bioquímica en la Universidad de Wisconsin y luego realizó una estancia posdoctoral en el Molecular Biology Laboratory de la Universidad de Wisconsin, en Estados Unidos. Actualmente es profesora emérita de la Facultad de Química de la UNAM e investigadora nacional de nivel 3. Ha dirigido numerosas tesis de licenciatura, maestría y doctorado y ha publicado más de 100 artículos científicos. Es miembro de la Academia Mexicana de Ciencias y ha recibido premios como el Premio Nacional de Química "Andrés del Río" y el Award of Corresponding Member, de la American Society for Plant Physiologists, EE.UU. Realiza investigación sobre los mecanismos de control transduccional y la regulación de la expresión genética en plantas superiores. Algunos de sus trabajos de investigación recientes se han publicado en revistas como *Plant Molecular Biology, Physiologia Plantarum, Biochemical Journal* y *Biochemistry*.

Dr. Fabio Salamanca Gómez

Es jefe de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Instituto Mexicano del Seguro Social, investigador nacional y profesor titular del Curso de Especialización en Genética Médica de la División de Estudios Superiores, Facultad de Medi-

cina de la UNAM. Es representante de México y Centroamérica en el International Registry of Chromosome Abnormalities. Es coeditor de la Revista *Archives of Medical Research* y de la revista *Gaceta Médica de México*. Autor de más de 200 artículos científicos en revistas como *Nature, Cancer Genetics, Cytogenetics, American Journal of Medical Genetics, American Journal of Human Biology*. Fue presidente de la Asociación Mexicana de Genética Humana y de la Asociación Mexicana de Antropología Biológica. Obtuvo el Premio Nacional de Obras Médicas de la Academia Nacional de Medicina por su libro sobre "Citogenética Humana. Fundamentos y Aplicaciones Clínicas". Obtuvo también el Premio "Everardo Landa" de la Academia Nacional de Medicina, el Premio "Eduardo Liceaga" de la Academia Nacional de Medicina, el Premio "Gonzalo Castañeda" de la Academia Mexicana de Cirugía, el Premio "Rafael Soto" de Obras Médicas, Academia Mexicana de Pediatría, el Premio "Adolfo Rivera" de la Asociación Mexicana de Nutrición y Endocrinología, el Premio "Dr. Héctor Márquez Monter" de la Asociación Mexicana de Genética Humana. Es integrante del Comité Editorial de las revistas científicas *Genetics, Annales de Genetique, American Journal of Medical Genetics* y *British Medical Journal*. Es miembro de la Comisión Nacional para el Genoma Humano.

Dr. Félix Recillas Targa

Obtuvo el doctorado en la Université Paris 7, en París, Francia. Realizó estancias posdoctorales en el Instituto de Biotecnología de la UNAM y en el National Institutes of Health, NIH, en Bethesda, Maryland, EE.UU. Actualmente es investigador del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Obtuvo la Beca Fogarty como "Visiting Fellow at the National Institutes of Health Visiting Program" en Bethesda, Maryland, EE.UU. Es miembro de la Sociedad Mexicana de Ciencias Genómicas y de la Academia Mexicana de Ciencias. Su área de investigación es la expresión genética de eucariontes. Ha publicado trabajos en revistas como *Proceedings of the National Academy of Sciences* de Estados Unidos, *Genes & Development*, *EMBO Journal, Cell Growth & Differentiation*, *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, International Review of Cytology.*

Dr. Fernando López Casillas

Investigador del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Es doctor por la Universidad de Purdue en EE.UU. y realizó estancia de posdoctorado en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center,

Nueva York, EE.UU. Recientemente obtuvo un donativo del Howard Hughes Medical Institute International Research Scholar.

Dr. Francisco Vergara Silva

Obtuvo el grado de doctor en la UNAM. Su trabajo versa sobre el papel de los genes del desarrollo en la biología de las plantas triuridales. Actualmente realiza una estancia posdoctoral en Suecia.

Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero

El doctor Soberón es director del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Obtuvo su doctorado en Investigación Biomédica Básica. Desde su incorporación a la UNAM en 1981, ha participado en el desarrollo y consolidación de la ingeniería genética y la biotecnología. A partir de 1984, fungiendo como secretario académico del mismo, inicia un grupo independiente en el área de la ingeniería de proteínas. Realizó estancias de investigación en el Instituto City of Hope, en California, se especializó en la síntesis química de oligonucleótidos y, posteriormente, en la Universidad de California en San Francisco. En los últimos años ha cultivado el moderno enfoque de Evolución Dirigida, en el ámbito de la biocatálisis. Tiene más de 65 publicaciones de investigación en revistas internacionales. Obtuvo en 1999 el Premio Nacional de Química "Andrés Manuel del Río". Ha publicado sus trabajos en revistas como *Nucleic Acid Research, Protein Engineering, Applied Biochemistry and Biotechnology, Enzyme and Microbial Technology* y *Molecular Microbiology.*

M. en C. Gabriel López Velázquez

Es candidato al grado de doctor de la UNAM. Actualmente es investigador del Instituto Nacional de Pediatría. Su trabajo se centra actualmente sobre la triosa fosfato isomerasa. Ha publicado en las revistas *Histochemistry and Cell Biology, Archives of medical Research, Biochemistry, Proteins*.

Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin

Es profesor de la Facultad de Ciencias de la UNAM, en donde obtuvo el grado de doctor. Actualmente es el coordinador del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Obtuvo el Premio de Ciencias Naturales del Consejo De-

partamental de Montevideo. Ha sido miembro del Cuerpo Editorial de la revista *Acta Anatomica* y es profesor titular honorario del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas del Ministerio de Educación y Cultura de la Universidad de la República Oriental del Uruguay. Ha publicado artículos de investigación sobre el núcleo celular en revistas como *Journal of Ultrastructural Research, Biology of the Cell, Chromosoma*, y un libro sobre microscopia electrónica.

Dra. Gladys Iliana Cassab

Es investigadora del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en donde realiza investigación sobre la influencia de proteínas de la pared celular en el desarrollo de las plantas superiores y en el desarrollo de raíz. Ha publicado en revistas como *Nature, Journal of Cell Biology, Methods in Enzymology, Annual Review of Plant Physiology* y *Plant Molecular Biology*.

Dra. Gloria Benítez-King

Obtuvo el doctorado en Biología Celular en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Después realizó una estancia de investigación en el Departamento de Neurobiología Molecular de la Universidad Estatal de Utrech, Holanda. Es investigadora y jefe del Departamento de Neurofarmacología del Instituto Nacional de Psiquiatría. Es investigadora nacional. Obtuvo el Premio de Psiquiatría Dr. Manuel Camelo Camacho en 1996. Su publicación en la revista *Experientia* se considera una cita clásica en el campo de la melatonina y como uno de los 38 trabajos más citados en la década 1990-1999. Su línea de investigación es el Estudio del Mecanismo de Acción de la Melatonina: Modulación del arreglo del citoesqueleto.

Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

Obtuvo el grado de doctora por parte en la UNAM. Actualmente desarrolla trabajo de investigación en la Facultad de Ciencias de la UNAM, estudiando la ultraestructura de diversas especies, con énfasis en la estructura nuclear.

Dr. Horacio Merchant Larios

Biólogo y doctor en ciencias de la UNAM. Realizó estudios posdoctorales en la Worcester Foundation for Experimental Biology

en Estados Unidos y en el Harbor General Hospital de la Universidad de California, en Los Ángeles. Investigador emérito de la UNAM. Realizó estudios en París. Actualmente es jefe del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Fue miembro fundador y primer presidente de la Sociedad Mexicana de Biología Celular. Pertenece a la Academia Mexicana de Ciencias. Ha sido profesor invitado en universidades de Francia, Estados Unidos, Inglaterra, Chile, Brasil. En 2001 obtuvo el Premio Universidad Nacional de Investigación en Ciencias Naturales. Ha publicado sus resultados de investigación en revistas como *Experimental Cell Research, Journal of Ultrastructural Research, Development, Developmental Biology* y *Archives of Andrology*. Es reconocido internacionalmente como especialista en Biología de la Reproducción.

Dra. Isaura Meza Gómez Palacio

Bióloga y doctora en Ciencias, la doctora Meza es pionera en México en el estudio del citoesqueleto, principalmente del de parásitos como la amiba. Fue fundadora y segunda presidenta de la Sociedad Mexicana de Biología Celular. También fue tesorera de la Academia Mexicana de Ciencias y es investigadora nacional.

Dr. Jesús Cortés Hermosillo

Médico cirujano de la Universidad Autónoma de Zacatecas, realizó una estancia posdoctoral en la Universidad de Yale trabajando en RNA pequeños. Actualmente es profesor/investigador de Bioquímica y Biología Molecular de la U.A.Z. Ha publicado trabajos en revistas como *Journal of Rheumatology, la Revista Mexicana de Reumatología* y el *EMBO Journal*.

Jesús Ramírez Santos

Realiza investigación en el Instituto de Investigaciones Biomédicas sobre diversos aspectos de la estructura del DNA en bacterias.

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

Es profesor titular de la Facultad de Química de la UNAM, Realizó estudios de posgrado en el Reino Unido. Es miembro de la Academia Mexicana de Ciencias. Su trabajo se centra en el me-

tabolismo del DNA durante la germinación de semillas de maíz, las enzimas responsables y su caracterización, el inicio de la germinación y el ciclo celular, así como las proteínas ciclinas/Cdks, PCNA y la fase G1.

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Obtuvo su doctorado en la UNAM. Actualmente es profesor de la Universidad Autónoma Metropolitana. Su línea de investigación es la fertilización *in vitro* de mamíferos. Ha publicado en revistas como *Bioquimia, Archives of Andrology, Andrologia, Theriogenology*.

Dra. Liora Shoshani

Es investigadora del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, en donde realiza trabajo de investigación sobre las señales y mecanismos que hacen que una célula se polarice y se asocie con las vecinas a través de contactos celulares y, más específicamente, cómo se contacta, expresa bombas y canales iónicos de un tipo dado, y los ubica. Ha publicado en revistas como *Annual Review of Physiology, American Journal of Physiology, Journal of Membrane Biology* y *European Journal of Physiology*.

Liz Izquierdo

Realizó investigación de posgrado en el Instituto de Ecología de la UNAM sobre los mecanismos moleculares del desarrollo en plantas.

Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel

Es investigadora del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, en donde realiza investigación sobre regulación del ensamble y sellado de las uniones estrechas por señales extracelulares y segundos mensajeros celulares y la identificación y caracterización bioquímica y molecular de proteínas asociadas a las uniones estrechas. Es autora de trabajos publicados en el *American Journal of Physiology,* y en el *Journal of Membrane Biology,* que se consideran entre los más citados en la literatura científica en los últimos diez años.

Dra. Lourdes Teresa Agreano Moreno

Obtuvo el grado de doctora en la UNAM, en donde actualmente desarrolla sus actividades académicas. Su trabajo de investigación trata sobre la ultraestructura de plantas y en especial sobre las partículas nucleares relacionadas con la expresión genética.

Dr. Luis Felipe Jiménez García

El doctor Luis Felipe Jiménez García es profesor titular del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Es biólogo, maestro en ciencias y doctor en ciencias por la UNAM. Realizó investigación doctoral en el Baylor College of Medicine del Centro Médico de Houston, Texas y trabajo posdoctoral en el Cold Spring Harbor Laboratory, de Nueva York. Ha publicado varios artículos en revistas especializadas como *Journal of Cell Science, Cell, Molecular Biology of the Cell, Journal of Structural Biology* y otras. También ha impartido numerosos cursos en el área de la Biología Celular y de la Microscopia. Es miembro fundador de la Sociedad Mexicana de Biología Celular y actualmente presidente de la misma. Fue presidente de la Asociación Mexicana de Microscopia. Ha organizado congresos internacionales de microscopia y de biología celular. Pertenece a la Academia Mexicana de Ciencias. En 1998 obtuvo la Distinción Universidad Nacional en Docencia en Ciencias Naturales. Fue coordinador de investigación y coordinador general del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Su trabajo se centra en la biología celular y molecular del núcleo.

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

Químico, maestro y doctor en Ciencias Biomédicas, Postdoctoral Institute for Cancer Research. Trabaja sobre las células troncales y su potencial diferenciativo, su relación con los orígenes de cáncer, la regulación y el papel de la muerte celular en el desarrollo embrionario y en enfermedades, regulación de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular con énfasis en los mecanismos moleculares que coordinan estos procesos y el control de los procesos regenerativos en mamíferos. Obtuvo el Premio Weissman de la Academia de la Investigación Científica en 1990. Es miembro de la Sociedad Mexicana de Biología Celular, de la Sociedad Mexicana de Bioquímica y de la Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo, así como de la Red de Medicina Genómica de la Academia Mexicana de Ciencias.

Luis Mendoza

Realizó estudios de posgrado en el Instituto de Ecología de la UNAM sobre aspectos teóricos de redes aplicadas al análisis del desarrollo de la flor y de la raíz.

Dr. Marcelino Cereijido Mattioli

Es investigador en fisiología celular y molecular de membranas biológicas en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. También es médico y doctor en medicina en Argentina. Obtuvo el Premio a la mejor Tesis Doctoral en 1962 en la Facultad de Ciencias Médicas de Buenos Aires. Después fue a Harvard Medical School, primero como becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas en Argentina (CNICT) y después como International Postdoctoral Research Fellow del Public Health Service de Estados Unidos. Fue profesor adjunto de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires de 1964 a 1966. Obtuvo el Premio “ODOL” del CNICT al mejor Científico en Biología menor de 35 años, en 1967. Fue director del Departamento de Biofísica del Centro de Investigaciones Médicas Albert Einstein de 1972 a 1976 e investigador de carrera del CNICT. También fue Adjunct Professor del Departament of Cell Biology, de la Universidad de Nueva York (1975-1979). Miembro de la John Simmon Guggenheim Foundation (1974). Actualmente es investigador nacional emérito. Obtuvo la Distinción de la Secretaría de Educación Pública por ser líder en la formación de doctores (1992). Premio Internacional de Ciencias “Bernardo A. Houssay” de la Organización de Estados Americanos (1993). Premio Internacional “Juchiman de Plata”. Premio Nacional de Ciencias y Artes (1995). Miembro de la American Society for Cell Biology, American Society of Physiology (ex miembro del International Committee), American Biophysical Society, etc. Miembro del Editorial Board de *News in Physiological Sciences* (1989-1998), del *Cellular Physiology and Biochemistry* (desde 1990) y de otras publicaciones científicas. Es miembro de la Academia Mexicana de Ciencias, de la Academia Mexicana de Medicina y de la Academia de Ciencias de América Latina. Autor de un centenar de artículos científicos internacionales *in extenso*, 10 libros, que van desde algunos científicos publicados en Londres y en Nueva York, a otros de divulgación y ensayo publicados en castellano. Cuenta con más de cinco mil citas bibliográficas documentadas por ISI. Ha publicado en revistas como *Journal of Cell Biology, American Journal of Physiology, Membrane Biology, Annual Review of Physiology,* y *Journal of Membrane Biology*.

Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Es bióloga, especialista en Microscopia Electrónica y Doctora en Ciencias de la UNAM. Es profesora de licenciatura y posgrado en biología celular de la UNAM. Fue investigadora del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Su línea de trabajo trata sobre la Estructura y Organización del Núcleo celular por Microscopia de Fuerza Atómica. Ha publicado trabajos científicos en revistas como *Biology of the Cell, Revista Latinoamericana de Microbiología, Experimental Cell Research, Molecular Biology of the Cell, American Journal of Pathology, Chest, Journal of Structural Biology, Molecular*.

Dra. Marieta Tuena Sangri

Investigadora emérita del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM e investigadora nacional emérita. Trabaja sobre los mecanismos de transducción de energía por la ATP sintasa, su regulación y las interacciones solvente-proteína.

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

Es investigador del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Obtuvo el grado de doctor en la UNAM y recibió becas de la McArthur Foundation Fellow y de la Pew Foundation Fellow para realizar posdoctorado en la Universidad de Stanford, EE.UU. y en la Universidad de Harvard, Cambridge. Recientemente recibió un donativo de la Howard Hughes Medical Institute International Research Scholar. Ha publicado en revistas como *Development, Molecular Biology of the Cell, Toxicon, Nucleic Acids Drug Development, Journal of Experimental Biology FEBS Letters* y *Molecular and General Genetics*.

Dra. Martha Espinosa Cantellano

Investigadora del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Su trabajo trata sobre la biología celular de *Entamoeba histolytica*.

Dra. Martha Verónica Ponce Castañeda

Actualmente realiza investigación en el Centro Médico Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Sus estudios han versado sobre los mecanismos de transducción de señales.

M. en C. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza

Es médico cirujano de la UNAM, en donde actualmente es candidato a doctor. Actualmente es profesor de Genética Médica en la Facultad de Medicina de la UNAM, e investigador asociado del Instituto Nacional de Pediatría. Es miembro certificado del Consejo Mexicano de Genética, Academia Nacional de Medicina.

Dr. Moisés Selman Lama

Es neumólogo con maestría en Biología Molecular. Es investigador director de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias e Investigador. Trabaja sobre las enfermedades fibrosantes del pulmón, área en la que ha publicado más de 100 artículos de investigación, 18 capítulos de libros y dos libros. Obtuvo el Premio de Investigación Médica, "Dr. Jorge Rosenkranz" en 1985, el Premio "Aida Weiss" 1988 y 1990, el Premio Anual de Investigación "Antonio López Silanes S.", 1989, el Premio de Investigación Fundación Glaxo Wellcome, 1995, en el área de investigación básica, y en 1996, el Premio "Miguel Otero" de Investigación Clínica. Obtuvo también la Beca "John Simon Guggenheim Memorial Foundation", 1993, el Premio "Salas Peyró 1998", Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

Obtuvo el grado de doctora de la UNAM. Posteriormente realizó una estancia posdoctoral en la Universidad de Oulu en Finlandia. Actualmente es investigadora del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Su línea de investigación es sobre los mecanismos celulares y moleculares de la diferenciación sexual en vertebrados en donde ha publicado sus trabajos en revistas como *Journal of Comparative Neurology, Journal of Experimental Zoology, Biology of Reproduction, Cancer, Developmental Biology, Molecular Reproduction and Development*.

Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez

Obtuvo el doctorado en la UNAM. Actualmente es profesora de la Facultad de Ciencias de la UNAM en donde investiga sobre el núcleo celular en interfase. Ha sido investigadora invitada del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España y de la Universidad de Lausana, Suiza. Es cofundadora del laboratorio de Microscopia Elec-

trónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Participó en la creación del Programa de Especialidad en Microscopia Electrónica de la UNAM. Ha publicado en revistas como *Biology of the Cell, Ultrastructural Pathology,* y *Chromosoma*.

Dra. Patricia León Mejía

Es investigadora del Instituto de Biotecnología, UNAM. Obtuvo el doctorado en la UNAM. Fue becaria de la Fundación Pew para realizar estudios posdoctorales en la Universidad de Harvard. Recientemente obtuvo un Howard Hughes Medical Institute International Research Scholar. Ha publicado sus trabajos en revistas como *Plant Cell, Journal of Biological Chemistry, Plant Physiology, Genes & Development, Genetics, Annual Review of Plant Physiology* y *Plant Molecular Biology*.

Dra. Rosalinda Tapia-López

Actualmente realiza investigación en el Instituto de Ecología de la UNAM sobre los mecanismos moleculares del desarrollo de las plantas.

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz

Es profesora de la Facultad de Ciencias de la UNAM, en donde ha impartido más de 50 cursos en la licenciatura y 20 en el posgrado en Ciencias Biológicas, así como cursos de actualización para profesores de bachillerato. Ha publicado 30 artículos de investigación en revistas internacionales. Coordinó el proyecto del actual plan de estudios de la licenciatura en biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM y el proyecto de adecuación del posgrado en ciencias biológicas de la UNAM. Ha publicado trabajos científicos en revistas como *Mutation Research* y *Molecular and General Genetics.*

Dr. Rubén Gerardo Contreras

Investigador del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Su trabajo se centra en el estudio de las propiedades fisiológicas de la membrana en los epitelios.

Dra. Susana Castro-Obregón

Obtuvo su doctorado en la UNAM y actualmente realiza estudios posdoctorales en el Instituto Buck en Estados Unidos. Ha sido Pew Latinoamerican Fellow. Su trabajo trata de los mecanismos de muerte celular durante el desarrollo, el envejecimiento y enfermedades asociadas. Sus resultados científicos los ha publicado en revistas como *Cell Death and Differentiation,* y *Journal of Biological Chemistry*.

M. en C. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

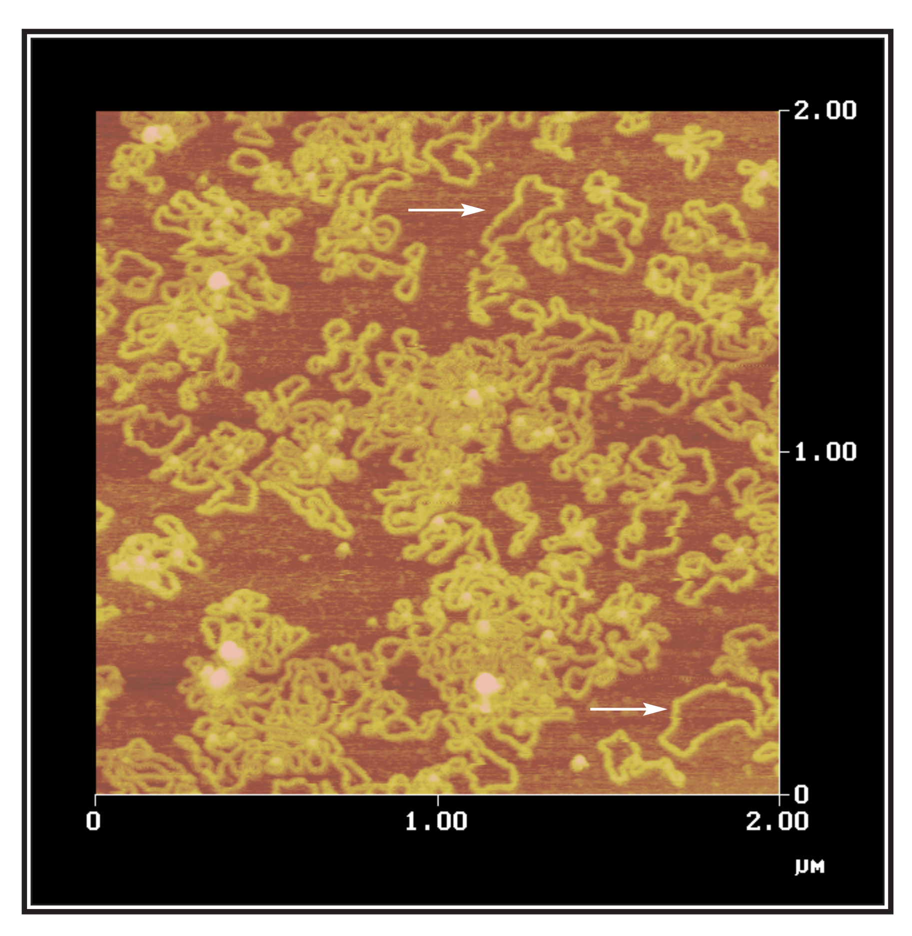
Es bióloga y candidata a doctora de la Universidad Autónoma Metropolitana. Actualmente es profesora de la misma universidad, en donde investiga sobre la Fertilización en Mamíferos. Ha publicado en revistas como *Zygote, Bioquimia* y *Andrologia*.

Biología celular y molecular

PARTE I

Moléculas informacionales

1. Ácido desoxirribonucleico, DNA
2. Ácido ribonucleico, RNA
3. Las proteínas
4. Control de la expresión genética en eucariontes
5. Genes homeóticos y mecanismos moleculares de diferenciación celular



Imágenes de moléculas de DNA por microscopia de fuerza atómica. La imagen corresponde a moléculas del plásmido pUC18, que se observan como lazos (flechas) sobre un soporte de mica.

CAPÍTULO 1

ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO, DNA

Jesús Ramírez Santos ■ Carmen Gómez Eichelmann

Introducción

El postulado principal de la teoría celular establece que toda célula se genera de una célula similar preexistente. Esta teoría formalizó la vieja observación de que la progenie de una especie biológica, al alcanzar el estado adulto, está compuesta de individuos con características similares a las de sus progenitores. La idea de que todos los organismos están formados por células la propuso por primera vez R. Hooke, alrededor de ¡1660!, al observar al microscopio unos cortes finos de corcho. Sin embargo, la teoría celular, como la conocemos actualmente, se fue construyendo a mediados del siglo XIX, con base en las observaciones de varios investigadores. En 1838, M. Schleiden encontró que los tejidos vegetales están formados por células y, unos cuantos años después, T. Schwann extendió esta observación a los animales. La trascendencia de este conocimiento se comprendió en 1858, cuando R. Virchow demostró que una célula no se genera espontáneamente, sino que proviene de otra célula igual.

Un año después, en 1859, Charles Darwin inició una de las mayores revoluciones intelectuales en la historia de la biología. La teoría de la evolución, propuesta por Darwin en su libro *El origen de las especies*, pretende explicar el origen de la inmensa diversidad de los seres vivos. Esta teoría, como la teoría celular, tiene que ver con la herencia; es decir, con la generación de organismos similares a sus progenitores. Darwin propuso dos ideas principales: 1) los organismos actuales son descendientes modificados de ancestros comunes, y 2) la fuerza principal que dirige los cambios evolutivos de los organismos es la selección natural. Darwin interpretaba la evolución como un proceso dinámico entre dos fuerzas: la tendencia de los organismos a aumentar su número y a generar variantes al reproducirse —ya que los descendientes no son idénticos a sus antecesores— y, por otro lado, la selección natural de las variantes mejor adaptadas a su ambiente. Esta teoría se ha modificado y enriquecido con conocimientos nuevos; sin embargo, los postulados originales continúan siendo la base de los principales estudios y polémicas de la biología moderna.

Las reglas de la transmisión de las características de la célula madre a la célula hija y de los padres a los hijos, o herencia, no se entendieron claramente sino hasta principios del siglo XX. El monje G. Mendel estableció las leyes de la herencia en 1865, unos cuantos años después de la publicación del libro *El origen de las especies*; sin embargo, no se reconoció su importancia sino hasta su “redescubrimiento” en 1905 por De Vries.

Los genetistas, como Mendel y De Vries, no estudiaban la molécula, estudiaban cambios heredables en los organismos: color de las semillas, forma de las flores, etc. Estos cambios visibles o fenotipos representan, a nivel de organismo, cambios en la información genética. En la década de 1940, T. H. Morgan, un genetista que eligió como modelo biológico de estudio a la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), dio un gran paso al identificar a los cromosomas como las estructuras celulares que contienen la información genética. Morgan descubrió que algunos cambios fenotípicos en las moscas se correlacionaban con cambios morfológicos en los cromosomas. Ya que los cromosomas contienen principalmente dos clases de moléculas, proteínas y ácido desoxirribonucleico (DNA), la pregunta era, ¿en cuál de estas moléculas se encuentra codificada la información genética? Esta pregunta se contestó en 1944, cuando O.T. Avery, C. MacLeod y M. McCarthy demostraron que el DNA de la bacteria *Pneumococcus pneumoniae* contenía la información genética. Avery y sus colaboradores aislaron, a partir de una cepa patógena de *P. pneumoniae*, una cepa no patógena. Los ratones inyectados con la bacteria patógena, pero no con la no patógena, enfermaban y morían. Esto sugería que la bacteria no patógena había perdido la información genética relacionada con la patogenicidad. Para contestar a la pregunta de cuál molécula celular contiene la información genética, estos investigadores diseñaron varios experimentos en los que se incubaron las bacterias no patógenas con proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos de las bacterias patógenas. Los resultados mostraron que, únicamente cuando las bacterias no patógenas se incubaban con DNA, éstas recuperaban la capacidad de infectar a los ratones. En 1952, Martha Chase y A.D. Hershey demostraron, con experimentos más confiables, que la información genética de un bacteriófago, o virus de la bacteria *Escherichia coli*, efectivamente se localiza en el DNA.

Para sorpresa de los científicos, si bien se conocía la estructura de las proteínas con bastante detalle, se sabía poco sobre la estructura secundaria del DNA. Dos investigadores, el inglés Francis Crick y el joven americano James Watson, se lanzaron con gran prisa y decisión a recopilar y analizar todo lo relacionado con la estructura química del DNA y los patrones de difracción de rayos X de esta molécula. En 1953, un año después, Watson y Crick lograron integrar un modelo de estructura secundaria para el DNA y pasar a la historia con sus ya famosos artículos publicados en la conocida revista *Nature* (Watson y Crick, 1953). En estos artículos anotaron: “No escapa a nuestra atención que el apareamiento específico que postulamos sugiere de inmediato un posible mecanismo de copia del material genético”. Para muchos investigadores, la publicación de los artículos de Watson y Crick marca el nacimiento de la biología molecular y en general el de la biología moderna.

A partir de 1953 se inició el estudio intensivo de los mecanismos moleculares que permiten la duplicación, reparación, recombinación y transposición del DNA y del procesamiento celular de la información genética presente en esta molécula. Actualmente sabemos que la información genética de todas las células se encuentra en el DNA; sin embargo, en el caso de algunos virus y bacteriófagos, ésta puede localizarse en moléculas de RNA.

La principal función del DNA es contener la información, que, al expresarse de manera selectiva y regulada, permite generar una nueva célula (organismos unicelulares) o un nuevo organismo, a partir de un óvulo fecundado por un espermatozoide (organismos multicelulares complejos). La expresión de esta información también determina el patrón metabólico característico de cada célula y de las condiciones específicas en que ésta se encuentra. La información del DNA primero se transcribe; es decir, se copia selectivamente a moléculas de RNA y posteriormente la información de algunas de estas moléculas se traduce a proteínas.

En resumen, la información genética de las células se encuentra en el DNA, se transcribe a moléculas de RNA y finalmente se traduce a proteínas. Esta regla, o dogma central de la biología molecular, se completó al descubrirse la transcriptasa reversa, una enzima que sintetiza DNA a partir de una molécula de RNA (figura 1-1).

En este capítulo se presenta un resumen de los estudios de Mendel y sus leyes de la herencia, la estructura química y la estructura secundaria del DNA, el código genético, la paradoja del valor C y la organización de las moléculas de DNA en la célula.



Leyes de la herencia (Mendel)

Las leyes básicas de la transferencia de la información genética fueron definidas por G. Mendel en 1865. El trabajo de Mendel, basado en la hibridación de plantas, fue fundamental para determinar el concepto de gen. Mendel utilizó como modelo experimental para estudiar las leyes de la herencia a cepas puras de plantas de chícharo (*Pisum sativum*), las cuales son fáciles

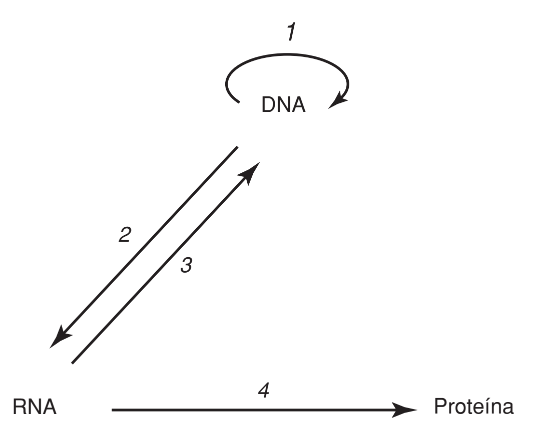


Figura 1-1. "Dogma" central de la biología molecular.
1. REPLICACIÓN DEL DNA. Síntesis de una nueva molécula de DNA de dos hebras, a partir de una molécula molde.
2. TRANSCRIPCIÓN DEL DNA. Síntesis de una hebra de RNA complementaria a una de las dos hebras del DNA.
3. TRANSCRIPCIÓN REVERSA DEL RNA. Síntesis de una hebra de DNA complementaria a una molécula de RNA, de una hebra.
4. TRADUCCIÓN DEL RNA MENSAJERO. Síntesis de una proteína a partir de la información codificada en un RNA mensajero.

de cultivar y cruzar. Para sus estudios estadísticos, este investigador seleccionó características fenotípicas fáciles de identificar como el color y la textura de las semillas.

En los organismos diploides las copias materna y paterna de un mismo gen se segregan de forma separada al formarse los gametos.

Antes de describir los experimentos que llevaron a Mendel a postular las leyes de la herencia, es importante definir dos términos: fenotipo y genotipo. A la apariencia de un organismo se le denomina fenotipo, mientras que el genotipo se refiere a la constitución genética. Por ejemplo, dos individuos que presentan el mismo fenotipo pueden tener un genotipo diferente. Estos conceptos quedarán más claros al describir la primera ley de la herencia (véase más adelante).

En una primera serie de experimentos de cruzas entre plantas de chícharos, Mendel encontró que en la primera generación, o generación F1, toda la progenie mostró solamente una de las dos características alternativas. Por ejemplo, todas las plantas producto de la cruza entre plantas de chícharos de semillas amarillas y de semillas verdes fueron de semillas amarillas. A las características que aparecieron en la generación F1, Mendel las llamó características dominantes (figura 1-2). Para responder a la pregunta de qué había pasado con las características alternativas, Mendel dejó que las

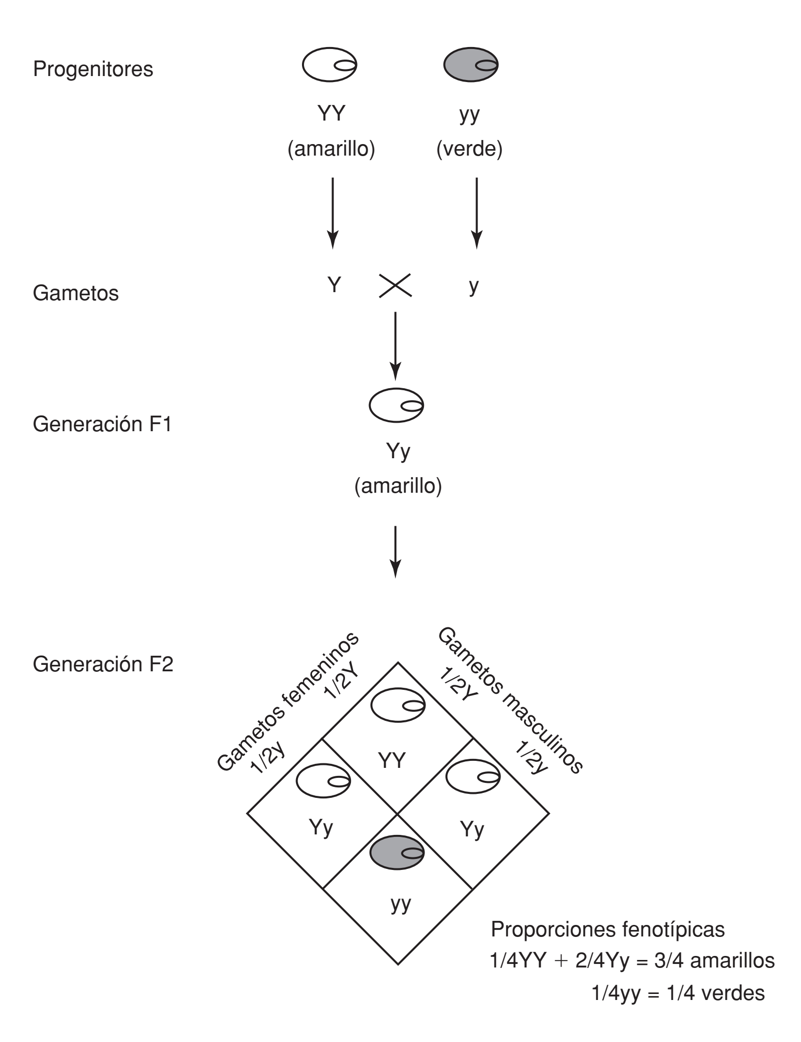


Figura 1-2. Primera ley de Mendel o principio de segregación. En este ejemplo se muestra la segregación de los factores mendelianos en la progenie de la generación F1 y F2, después de la cruza de plantas con dos alelos, siendo los alelos dominantes (YY) para las semillas amarillas y los recesivos (yy) para las semillas verdes. El fenotipo de todos los individuos de la F1 es amarillo, pero el genotipo es heterocigoto: Yy. En la generación F2, las células espermáticas y los óvulos se combinan al azar para generar una relación de fenotipos de 3 dominantes (amarillos) y un recesivo (verdes).

plantas de la F1 se autopolinizaran. Las características que habían desaparecido en la F1 reaparecieron en la segunda generación, o F2. Mendel llamó a estas características como recesivas y concluyó que las características heredadas eran determinadas por factores discretos, pero separables. Estos factores necesitaban estar en las plantas de la F1 en forma de pares: un par era heredado del progenitor materno y el otro del paterno. Los factores apareados se separaban otra vez cuando las plantas de la generación F1 producían células sexuales maduras o gametos. Cada gameto contendría uno solo de los miembros del par original. Así, en su primera ley o principio de segregación, Mendel propuso: "Los dos miembros de un par de factores se segregan separados en cada uno de los gametos, por lo que la mitad de los gametos lleva un miembro de un par y la otra mitad de los gametos lleva al otro factor" (Curtis y Barnes, 1989).

Ahora sabemos que en los organismos diploides los genes se encuentran en pares conocidos como alelos. Por ejemplo, el color de las semillas, amarillo y verde, está determinado por alelos diferentes. La manera como una característica se expresa está determinada por la combinación particular de los alelos presentes en cada organismo. Si los alelos son los mismos, por ejemplo YY o yy, entonces se dice que el organismo es homocigoto para esa característica particular; si los dos alelos son diferentes, por ejemplo Yy, entonces el organismo es heterocigoto para esa característica. En el caso de que Y sea dominante sobre y, una planta YY y otra Yy tendrían el mismo fenotipo, pero diferente genotipo.

> En los organismos homocigotos, las copias materna y paterna de un mismo gen son iguales; en los heterocigotos son diferentes.

Cuando se forman los gametos, éstos contienen solamente un alelo de cada gen determinado. Cuando los dos gametos se unen para formar el huevo fertilizado, los alelos se aparean nuevamente. Si dos alelos de un par dado son iguales (homocigoto), la característica que ellos determinan se puede expresar. Si los alelos son diferentes (heterocigoto), uno de los alelos puede ser dominante sobre el otro. Un alelo dominante es aquel que produce su característica particular tanto en los hetero como en los homocigotos. En heterocigotos, para algunas características no hay dominancia ni recesividad, sino codominancia. En la codominancia se expresan los dos alelos del gen, lo que genera un fenotipo combinado. Por ejemplo, en la cruza de plantas con flores rojas y blancas, cuando las características de flor roja y blanca no son dominantes ni recesivas, se pueden generar plantas con flores de color rosa (Curtis y Barnes, 1989).

En una segunda serie de experimentos, Mendel estudió la cruza de plantas que diferían en dos características. Por ejemplo, en la cruza entre plantas con semillas lisas y amarillas y plantas con semillas rugosas y verdes, las características liso y amarillo son dominantes y las características rugoso y verde son recesivas. Como se esperaba, las semillas resultantes de la generación F1 fueron semillas lisas y amarillas. Cuando las plantas derivadas de estas semillas se autopolinizaron, de las plantas resultantes una proporción de 9/16 mostraron las dos características dominantes (semillas lisas y amarillas), y solamente 1/16 mostraron características recesivas (semillas rugosas y verdes). El resto de las plantas se distribuyó de la siguiente manera: 3/16 fueron amarillas y rugosas y 3/16 fueron verdes y lisas; es decir, aparecieron combinaciones nuevas de las dos características (figura 1-3).

> Las características genéticas se segregan de manera independiente.

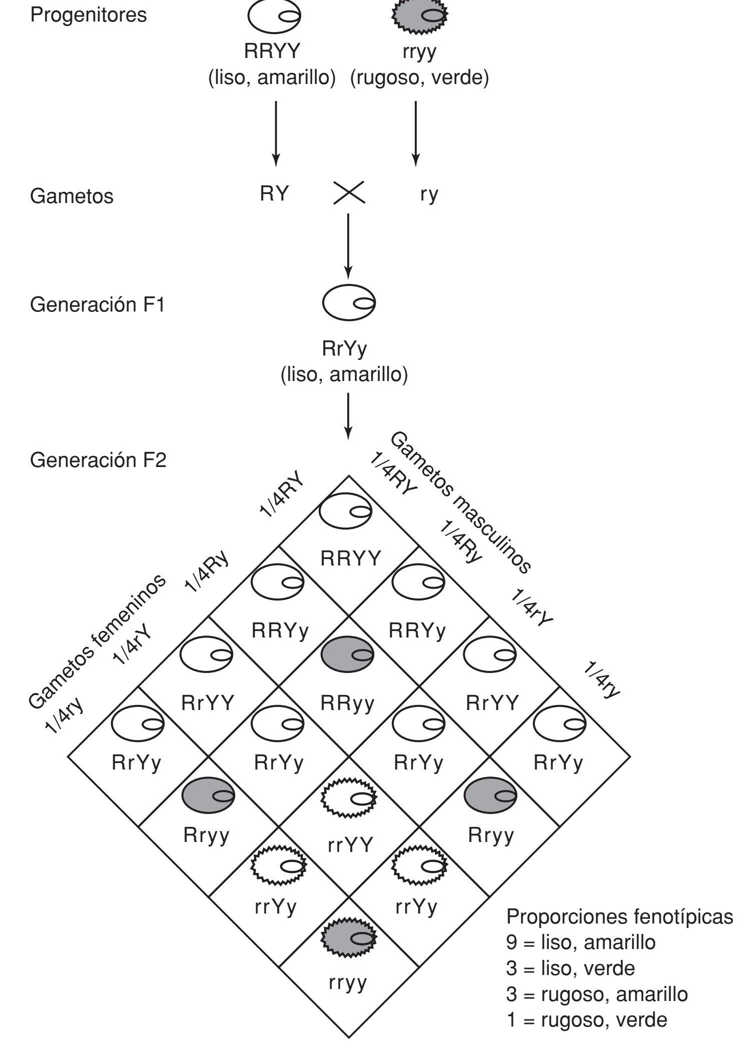


Figura 1-3. Segunda ley de Mendel o principio de segregación independiente. En este ejemplo se muestra la cruza de individuos homocigotos, uno con factores dominantes de semillas lisas (RR) y amarillas (YY) y el otro de semillas rugosas (rr) y verdes (yy). En la generación F1, todos los descendientes son de semillas amarillas y lisas. En la generación F2 la distribución de los factores en los gametos da lugar a la combinación de 16 genotipos diferentes y 4 fenotipos. La distribución de los diferentes genotipos se genera por una segregación independiente de los factores.

Estos resultados no contradicen a los resultados de la primera ley, ya que, si las dos características son consideradas independientemente, se mantiene la proporción de 3:1 entre las características lisa y rugosa y color amarillo y verde. Esto mostró que las características de textura y color de las semillas se comportaron como características independientes una de la otra. A partir de estas observaciones, Mendel postuló su segunda ley, o principio de segregación independiente. Este principio establece que, cuando los gametos se forman, los alelos de un gen para una característica dada se segregan independientemente de los alelos para otra característica (Curtis y Barnes, 1989).

Estructura química del DNA

Las células contienen varias macromoléculas, como son los polisacáridos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Estas macromoléculas pueden clasificarse co-

mo polímeros; es decir, moléculas que tienen una unidad estructural que se repite muchas veces. Los polisacáridos se forman por la unión de monosacáridos, las proteínas por la de aminoácidos y los ácidos nucleicos por la de nucleótidos. Los ácidos nucleicos son de dos clases: a) ácido desoxirribonucleico o DNA, que tiene como unidad estructural al desoxirribonucleótido o desoxinucleótido, y b) el ácido ribonucleico o RNA, que tiene al ribonucleótido.

En esta sección se presenta la estructura química y la estructura secundaria del DNA, mientras que en el capítulo 2 se revisa la estructura del RNA.

La molécula de DNA es un polímero que se forma por enlace covalente de miles de desoxinucleótidos. El desoxinucleótido, o unidad estructural del DNA, contiene un ácido fosfórico, un azúcar de 5 átomos de carbono o pentosa y una base nitrogenada. El DNA contiene 4 bases nitrogenadas: adenina (A) y guanina (G), que derivan de la purina, y citosina (C) y timina (T), que derivan de la pirimidina (figura 1-4). El enlace de la pentosa (que en el caso del DNA es una desoxirribosa) y una base nitrogenada forma una molécula denominada deoxinucleósido. La unión de un ácido fosfórico a esta molécula forma el desoxinucleótido (figura 1-4).

> El DNA es un polímero de desoxinucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster.

Citosina
Timina
Guanina
Adenina
Bases nitrogenadas

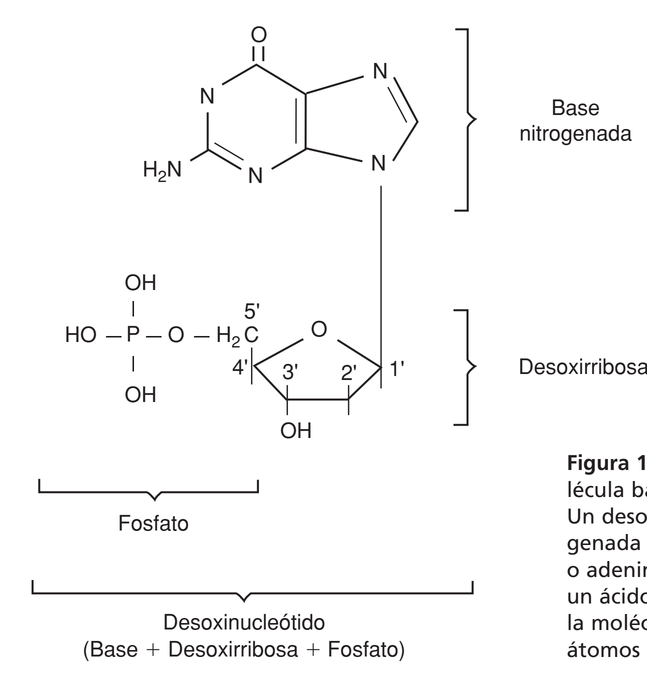


Figura 1-4. Estructura química del DNA. La molécula base en el DNA es el desoxinucleótido. Un desoxinucleótido contiene una base nitrogenada que puede ser citosina, timina, guanina o adenina unida a un azúcar (desoxirribosa) y un ácido fosfórico unido a la desoxirribosa. En la molécula de desoxirribosa se numeran los átomos de los 5 carbonos que la constituyen.

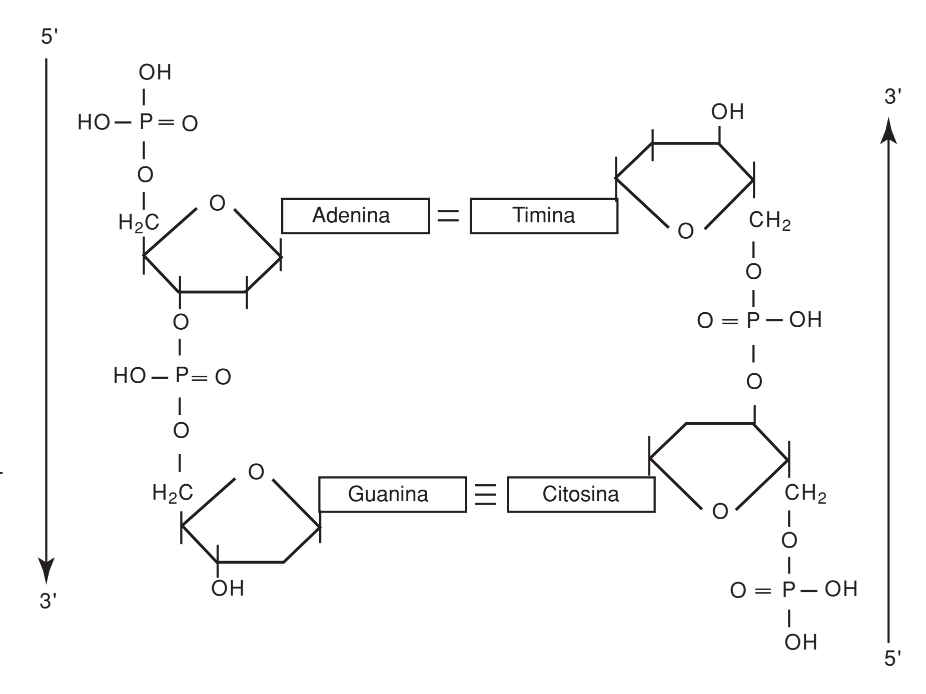


Figura 1-5. Posición antiparalela de las dos hebras de polidesoxinucleótidos en el DNA. En el DNA, las dos hebras de polidesoxinucleótidos están orientadas de manera que una hebra va en dirección 5' a 3' y la otra de 3' a 5'.

Los desoxinucleótidos se unen para formar el polímero lineal, o polidesoxinucleótido, en el cual el grupo fosfato en posición 5' de la desoxirribosa se une por un enlace éster con el hidroxilo 3' de la desoxirribosa del desoxinucleótido vecino, y así sucesivamente. El polímero forma una hebra donde se alternan una desoxirribosa y un fosfato, mientras que las bases se unen perpendicularmente a ésta (figura 1-5).

La proporción relativa de cada una de las bases del DNA, así como el orden o secuencia en que se encuentran, varía de organismo a organismo, ya que la secuencia de bases, específica para cada organismo, contiene la información genética que define a ese organismo. Actualmente, existe la tecnología que permite conocer la secuencia de bases de todo el DNA de un organismo. Por ejemplo, ya se cuenta con las secuencias completas de más de 60 procariontes, entre ellas, las de las bacterias *Haemophilus influenzae* y *Escherichia coli* y la de la arquea *Methanococcus jannaschii* (Fleischmann y cols., 1995; Blattner y cols., 1997; Bult y cols., 1996). También, ya se tienen las secuencias genómicas de algunos organismos eucariónticos como son las del hongo *Saccharomyces cerevisiae*, la planta *Arabidopsis thaliana*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y la del humano (Goffeau y cols., 1996; Kaul y cols., 2000; Adams y cols., 2000; McPherson y cols., 2001; Venter y cols., 2001). La información relacionada con los programas de secuenciación de procariontes puede consultarse en http://www.tigr.org/tdb.

La molécula de DNA está formada por dos hebras antiparalelas unidas por puentes de hidrógeno entre bases complementarias, A-T y C-G: modelo de Watson y Crick.

La estructura secundaria del DNA propuesta por Watson y Crick es una hélice de giro a la derecha formada por dos hebras de polidesoxinucleótidos orientadas en sentido antiparalelo; es decir, el extremo 5' de una hebra queda frente al extremo 3' de la otra. Esto significa que, en uno de los extremos

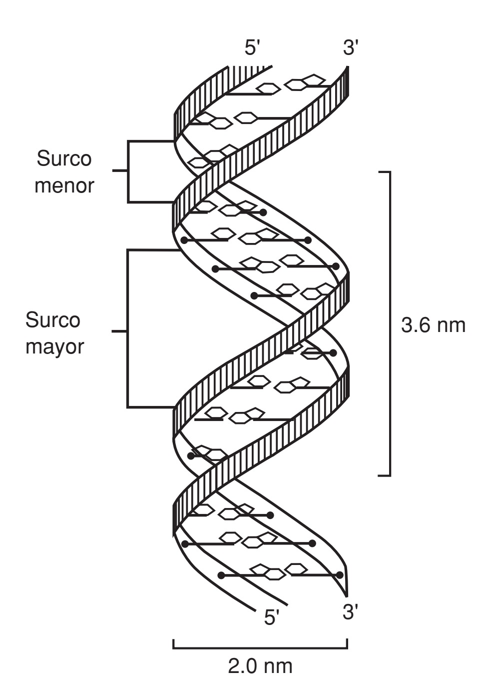


Figura 1-6. Estructura secundaria de la hélice de dos hebras de polidesoxinucleótidos en el DNA. La estructura secundaria del DNA-B es una hélice de giro a la derecha formada por dos hebras de polidesoxinucleótidos antiparalelos. En el exterior de la hélice se alternan moléculas de desoxirribosa y ácido fosfórico, mientras que las bases nitrogenadas se proyectan perpendicularmente hacia el interior. Las bases se unen por puentes de hidrógeno de manera específica: adenina con timina y citosina con guanina.

de la molécula de DNA, una hebra tiene el ácido fosfórico que se une al carbono 5' de la desoxirribosa libre y en el otro extremo contiene la desoxirribosa con el –OH 3' libre; la otra hebra tiene, frente al ácido fosfórico 5', la desoxirribosa con el –OH 3' libre y frente a la desoxirribosa con el –OH libre, un ácido fosfórico 5' (figuras 1-4, 1-5 y 1-6).

Las dos hebras se unen por puentes de hidrógeno que se establecen de manera específica o complementaria entre las bases de las dos hebras. Una molécula de adenina se une, por dos puentes de hidrógeno, a una de timina; y una de guanina se une por tres a una de citosina. En la parte exterior de la hélice, se alternan moléculas de desoxirribosa y fosfato, mientras que las bases se proyectan perpendicularmente hacia el interior (figura 1-6).

La hélice tiene alrededor de 10 pares de bases por vuelta y un diámetro de 2 nm. La distribución helicoidal de los desoxinucleótidos determina la formación de una superficie exterior con un surco mayor ancho y uno menor angosto (figura 1-6). Las 10 bases de una vuelta de hélice quedan expuestas hacia el surco mayor, si se les observa desde un ángulo, y hacia el surco menor, cuando se les observa desde otro. Muchas de las proteínas que interactúan de manera específica con ciertas secuencias de bases en el DNA lo hacen a través del surco mayor, ya que en este surco las bases se encuentran más expuestas. Estas interacciones son muy importantes para la regulación de la expresión genética.

El DNA-B representa la estructura "ideal" del DNA, una estructura que se obtiene al cristalizar el DNA con sodio como contra-ion y 92% de humedad. El DNA-B, como lo describieron originalmente Watson y Crick, posiblemente representa la estructura predominante en el DNA de las células, ya que los patrones de difracción de rayos X de DNA puro son similares a los que se obtienen con el DNA presente en cabezas intactas de espermatozoides.

El DNA es una molécula helicoidal que puede adoptar estructuras alternativas: DNA-B, DNA-B curvo, DNA-A, DNA-C, DNA-Z.

Antes de conocerse la estructura tridimensional del DNA, se sabía que la molécula era polimórfica; es decir, podía presentar más de una forma. Los ingleses Maurice Wilkins y Rosalind Franklin encontraron que, cuando el DNA se cristalizaba en presencia de cantidades distintas de agua, se generaban patrones de difracción diferentes. Por ejemplo, en condiciones de baja humedad (75%), el DNA-B presenta un cambio conformacional reversible a una nueva estructura más ancha y rígida, denominada DNA-A. Otra estructura alternativa del DNA es el DNA-C que se forma con sodio a una concentración elevada y una humedad intermedia entre la que se requiere para favorecer las estructuras DNA-A y DNA-B.

Además del DNA-A, DNA-B y DNA-C, existen otras conformaciones alternativas para la hélice del DNA; sin embargo, es muy difícil probar cuáles existen *in vivo* y, sobre todo, qué función cumple cada una de ellas (Rich, 1993).

La hélice a la derecha del DNA puede no solamente presentar estructuras alternativas, dependiendo del medio en que se encuentra, sino que puede presentar curvaturas espontáneas en regiones con secuencias específicas. La flexibilidad y ángulo de la curvatura varían, según la secuencia. Muchas secuencias que producen curvaturas pronunciadas contienen varias adeninas seguidas (poliA); sin embargo, existen secuencias que no contienen poliA y presentan curvaturas importantes (Allewell, 1988).

Las regiones de DNA curvo posiblemente son importantes para favorecer varios sucesos celulares, como son la replicación, la expresión de algunos genes y la compactación de ciertas regiones del DNA (Pérez-Martín y cols., 1994).

En 1979, A. Rich y sus colaboradores describieron una nueva e inesperada estructura tridimensional del DNA: DNA-Z. Esta estructura se encontró al estudiar por difracción de rayos X los cristales de un fragmento de DNA de 6 pares de nucleótidos con una secuencia de bases CGCGCG. Este fragmento se sintetizó químicamente. La nueva estructura es también una hélice de dos cadenas antiparalelas y complementarias; sin embargo, mientras la hélice del DNA-B gira suavemente a la derecha, la del DNA-Z gira en cortes bruscos (zigzag) a la izquierda, y tiene un diámetro menor y 12 pares de bases por vuelta de hélice. En el DNA-Z las bases quedan más expuestas que en el DNA-B (Wang y cols., 1979).

Posteriormente se encontró que cualquier fragmento de DNA con una secuencia de bases donde se alternan purinas y pirimidinas puede adquirir la configuración Z. El DNA-Z es una estructura inestable y fácilmente adopta la conformación B (Nordheim y cols., 1982; Wang y cols., 1979). La presencia de regiones de DNA-Z en el DNA celular se ha estudiado principalmente con anticuerpos que reconocen y se unen específicamente al DNA-Z. Con estos anticuerpos se demostró la presencia de regiones Z en varios organismos: bacterias, mosca de la fruta, trigo y mamíferos. Otro enfoque que se utiliza para estudiar al DNA-Z es la búsqueda de proteínas que se unen específicamente a este DNA. A la fecha, se han descrito varias de estas proteínas, como es la zuotina de levadura, la histona H-1 de mamífero y una proteína de núcleo de células de pollo (Nordheim y cols., 1982; Zhuang y cols., 1992; Wittig y cols., 1989).

Los resultados de los estudios con DNA-Z sugieren que este DNA tiene un papel importante en la transcripción de la información genética y en determinar la posición de los nucleosomas (ver más adelante), después de que una región de DNA se transcribe.

El concepto previo de una molécula de DNA relativamente estable y monótona se ha sustituido por el de una molécula muy dinámica, con una estructura plástica que se modifica de acuerdo con la secuencia de bases, concentración de iones, pH, temperatura, unión de proteínas, tensión estructural de la hélice, etc.



Codificación de la información genética en el DNA

En el DNA de las células de un organismo se encuentra toda la información genética que lo define. Un gen, es decir, una unidad de información genética, contiene la información para la síntesis de una molécula de RNA que es complementaria a una de las dos hebras del DNA. Los principales RNA celulares son el RNA ribosomal (rRNA), el RNA de transferencia (tRNA) y el RNA mensajero (mRNA). Cada molécula de mRNA contiene la información para la secuencia de aminoácidos de una proteína, mientras que las moléculas de rRNA y de tRNA forman parte de la maquinaria celular que traduce la información de los mRNA a proteínas.

> La información genética codifica para todas las moléculas de proteína y RNA presentes en un organismo.

En resumen, la información para las moléculas de RNA y para las proteínas presentes en una célula está codificada en el DNA de ese organismo.

La información para la secuencia de aminoácidos de una proteína está codificada en el mRNA, en unidades independientes de tres bases llamadas codones. La combinación de cuatro letras, A, T, C y G en el DNA, o A, U, C y G en el mRNA, en unidades de tres, puede generar 64 codones (4^3). Los 64 codones y el significado de cada uno constituyen el código genético (cuadro 1-1). Una proteína está formada por la combinación de alrededor de 20 aminoácidos diferentes, por lo que varios codones pueden codificar para un mismo aminoácido. Por ejemplo, el aminoácido leucina (Leu) está codificado por los codones UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, y CUG (cuadro 1-1). Esta propiedad se denomina "degeneración" del código genético. Tres de los 64 codones no codifican para un aminoácido, sino que funcionan como señal de terminación en la síntesis de proteínas (cuadro 1-1).

> La información genética para las proteínas está codificada en tripletes de bases o codones: código genético.

El código genético es universal; la secuencia de aminoácidos de la proteína de una bacteria y de la de una humana se encuentran codificadas en el DNA por el mismo código; sin embargo, por la degeneración de éste, es posible que un mismo aminoácido se encuentre preferentemente codificado por un codón en la bacteria y por otro en el humano. Si bien el código es el mismo para todos los organismos, existen algunas excepciones. Por ejemplo, en el DNA presente en las mitocondrias de la levadura y del humano, el codón de terminación UGA codifica para triptófano.

> El código genético es prácticamente igual para todos los organismos.

Además del código genético, que permite decodificar la información de los mRNA para sintetizar proteínas, el DNA contiene información para regular la expresión de los genes. Por ejemplo, en el DNA está la información para marcar el sitio en el cual la enzima que transcribe a los genes, o RNA-

Cuadro 1-1. Código genético

Primera posición (5')	Segunda posición				Tercera posición (3')
	U	C	A	G	
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA Término UAG Término	UGU Cys UGC Cys UGA Término UGG Trp	U C A G
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	U C A G
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	U C A G
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	U C A G

Nomenclatura de los aminoácidos: Ala, alanina; Arg, arginina; Asn, asparagina; Asp, ácido aspártico; Cys, cisteína; Glu, ácido glutámico; Gln, glutamina; Gly, glicina; His, histidina; Ile, isoleucina; Leu, leucina; Lys, lisina; Met, metionina; Phe, fenilalanina; Pro, prolina; Ser, serina; Thr, treonina; Trp, triptófano; Tyr, tirosina y Val, valina.

polimerasa, tiene que empezar y terminar de copiar, así como la información que determina cuándo y cuántas copias hay que sintetizar. En general, las secuencias de bases que contienen esta información son distintas para diferentes organismos, por lo que no existe un código universal de secuencias reguladoras.



El tamaño del genoma de los organismos y la paradoja del valor C

No todas las secuencias presentes en el DNA representan genes.

La cantidad total de DNA presente en las células, o valor C, varía entre los diferentes organismos. En los procariontes (bacterias y arqueas), el tamaño de los genomas varía en un intervalo de aproximadamente 20 veces, de 6×10^5 pares de bases (pb) en algunos organismos parásitos intracelulares obligados (micoplasmas), a más de 10^7 pb en varias cianobacterias. En cambio, en los eucariontes los valores C (cantidad de DNA contenida en un genoma haploide) son mayores que en los procariontes, aunque hay excepciones. Por

ejemplo, la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) tiene un genoma del tamaño del de las cianobacterias. La variación en los valores C en eucariontes es mucho mayor que en las bacterias. Esta variación va de aproximadamente 8×10^6 a 7×10^{11} pb, lo que representa un intervalo de diferencia de más de 80,000 veces. En particular, los protistas (amibas, euglenas, paramecios, tripanosomas, entre otros) muestran una gran variación en el valor C. Esta variación en el tamaño del genoma entre los eucariontes no tiene relación directa con la complejidad del organismo o con el número de genes codificados en el genoma. Por ejemplo, varios protistas poseen mucho más DNA que los mamíferos. Por otra parte, organismos que parecen muy similares en complejidad (moscas y langostas, cebolla y lirio, *Paramecium aurelia* y *P. caudatum*) muestran una gran variedad en el valor C. A esta falta de relación entre los valores C y la complejidad del organismo se le conoce como la paradoja del valor C. Sin embargo, esta paradoja desaparece, si se compara el número de genes y la complejidad de los organismos. En este caso, sí existe una relación; por ejemplo, los organismos más complejos contienen un número mayor de genes que los más sencillos. La paradoja C significa que los genomas contienen, además de genes, es decir secuencias que codifican para las moléculas de RNA y proteínas presentes en la célula, otras secuencias. Efectivamente, los genomas contienen secuencias de DNA de tamaño variable (menos de 10 a miles de nucleótidos) que se encuentran repetidas de cientos a miles de veces en los genomas. Estas secuencias pueden estar una a continuación de otra o dispersas por todo el genoma. La secuencia y el número de copias por genoma de estas secuencias repetidas varían de organismo a organismo. Por ejemplo, en el genoma humano, la secuencia repetida de 300 pb llamada Alu se encuentra repetida más de 300,000 veces, y la suma de todas las secuencias repetidas constituye aproximadamente 35 a 45% del genoma (McPherson y cols., 2001; Venter y cols., 2001). A la fecha, aunque hay hipótesis atractivas para explicar su origen y se han propuesto varios mecanismos moleculares para su amplificación (transposición, retrotransposición), no se conoce bien la función de muchas de estas secuencias repetidas.

En el humano existen alrededor de 10 clases diferentes de secuencias repetidas pequeñas que representan aproximadamente 1% del DNA. Las copias de una clase de estas secuencias son muy similares en cuanto a la secuencia de bases, pero su número varía de individuo a individuo. Esta característica permite identificar a cada individuo de manera similar a las huellas digitales. Esta identificación es muy precisa, si se utiliza la secuencia repetida conocida como minisatélite. Ésta se encuentra repetida de 20 a 50 veces, tiene un tamaño de 15 a 100 pb y se localiza en regiones relativamente pequeñas de aproximadamente 1,000 a 5,000 pb. Cada humano presenta un número y distribución característicos de estas secuencias, lo que permite diferenciar incluso a hermanos (Jeffreys y cols., 1985). El análisis requiere de muy poco DNA, de manera que una gota de sangre o un poco de semen es suficiente. Este método se utiliza actualmente en medicina legal para la identificación de criminales, de violadores o de personas, o restos de personas, cuya identidad se desconoce.

Ciertas secuencias pequeñas repetidas del DNA humano pueden utilizarse con más precisión que las huellas dactilares para la identificación de personas.

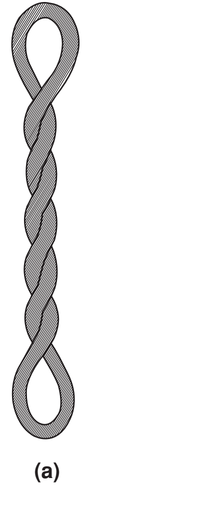


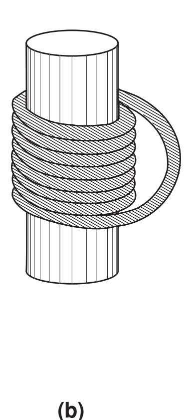
Organización de las moléculas de DNA en las células

La molécula helicoidal de DNA se organiza dentro de las células en estructuras superenrolladas.

Normalmente, las moléculas de DNA se encuentran en las células organizadas en estructuras compactas, en las que la hélice se encuentra bajo una fuerte tensión estructural. Esta tensión determina que las moléculas adopten una configuración superenrollada. El superenrollamiento puede ser de dos tipos: plectonémico y toroidal (Gómez-Eichelmann y Camacho-Carranza, 1995). Si se toma un eje imaginario que pasa por el centro, a lo largo de la hélice del DNA, el superenrollamiento plectonémico es aquel en el que este eje forma, a su vez, una hélice en el espacio (figura 1-7a). En el superenrollamiento toroidal, el eje se enrolla alrededor de proteínas (figura 1-7b).

El grado de superenrollamiento plectonémico del DNA está determinado principalmente por la acción de enzimas llamadas topoisomerasas. Las topoisomerasas cortan y ligan nuevamente las hebras del DNA, después de que éstas han cambiado su posición en el espacio, lo que genera un cambio en la topología o estructura tridimensional de la molécula. Las topoisomerasas son de dos clases: I y II. Las de clase I cortan una de las dos hebras del DNA, no requieren ATP y causan el relajamiento progresivo de las moléculas superenrolladas de DNA, mientras que las de clase II requieren ATP, cortan las dos hebras del DNA y las ligan después de que éstas rotan en el espacio, introduciendo supervueltas en el DNA. En el caso de las bacterias, algunas de las topoisomerasas de clase II son capaces de cambiar la posición de las hebras, antes de unirlas nuevamente. Estas enzimas se denominan girasas. Las otras topoisomerasas de clase II requieren que el cambio espacial de las hebras del DNA se realice por un mecanismo independiente; por ejemplo, la unión de proteínas al DNA. El superenrollamiento toroidal se genera principalmente por la interacción de proteínas con carga positiva (básicas) con el DNA y la acción de las topoisomerasas, tanto de clase I como de II (Gómez-Eichelmann y Camacho-Carranza, 1995).





(a) (b)

Figura 1-7. Superenrollamiento plectonémico y toroidal del DNA. Si se toma un eje imaginario que pasa por el centro a lo largo de la hélice del DNA, el superenrollamiento plectonémico es aquel en el que este eje forma a su vez una hélice en el espacio **a).** En el superenrollamiento toroidal, el eje se enrolla alrededor de una estructura cilíndrica **b).**

El genoma de las bacterias frecuentemente se encuentra en una sola molécula circular de DNA; sin embargo, hay bacterias con dos moléculas circulares o con una o más moléculas lineales. Cada molécula contiene una región a partir de la cual se inicia su replicación. Este DNA, como el DNA de todas las células, tiene un tamaño muy grande en relación con el volumen que ocupa en la célula. Esto hace que el DNA bacteriano se encuentre en las células en una estructura muy compacta denominada nucleoide. El nucleoide contiene, además de la molécula de DNA condensada aproximadamente 1,000 veces, moléculas de RNA, enzimas como la RNA polimerasa y las topoisomerasas y proteínas básicas (Gómez-Eichelmann y Camacho-Carranza, 1995). En muchas bacterias, además de la o las moléculas de DNA que contienen la información genética esencial y que se localizan en el nucleoide, pueden encontrarse moléculas de DNA adicionales más pequeñas o plásmidos. El tamaño pequeño de algunas de estas moléculas y la posibilidad de purificarlas, de adicionarles o quitarles fragmentos de DNA y de introducirlas nuevamente a las bacterias, permitió el nacimiento de la ingeniería genética.

En los procariontes, la información genética está en una molécula circular o lineal de DNA, organizada en el nucleoide.

El modelo actual de nucleoide más completo es el de la bacteria *E. coli*. Este modelo propone que en la célula, la molécula circular de DNA cerrada de 4.64×10^6 pb (aproximadamente, 4,300 genes) y de alrededor de 1 mm de longitud, se encuentra organizada en asas con superenrollamiento plectonémico. Alrededor de 50% del DNA se encuentra, además, en superenrollamiento toroidal, alrededor de proteínas similares a las histonas de células eucariónticas (Gómez-Eichelmann y Camacho-Carranza, 1995) (figura 1-8).

El nucleoide es el equivalente de la cromatina de células eucariónticas (véase más adelante). Sin embargo, esta estructura difiere de la cromatina en dos características principales: 1) las proteínas básicas (tipo histona) presentes en el nucleoide no forman estructuras regulares y compactas como las histonas en los nucleosomas de la cromatina, sino que presentan una or-

Figura 1-8. Estructura del nucleoide bacteriano. La molécula de DNA de la bacteria *Escherichia coli* se organiza en asas independientes con superenrollamiento plectonémico. La unión de proteínas tipo histona a esta estructura base genera, además, regiones de superenrollamiento toroidal.

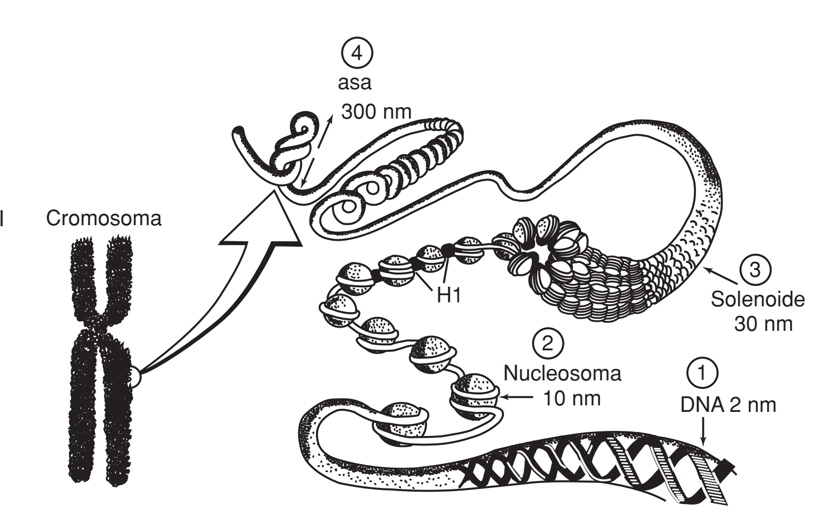


Figura 1-9. Estructura de la cromatina en los cromosomas metafásicos. Niveles de organización de la molécula de DNA: 1) molécula de DNA de 2 nm de diámetro; 2) el DNA se enreda alrededor de un octámero de histonas para formar estructuras discretas de 10 nm de diámetro o nucleosomas; 3) la histona H1 compacta a los nucleosomas y éstos forman una hélice o solenoide de 30 nm de diámetro; 4) el solenoide se organiza en asas muy compactas de 60 nm de diámetro y 300 nm de largo.

ganización menos compleja y se disocian más fácilmente del DNA; 2) la tensión helicoidal que compacta al DNA del nucleoide es tanto de tipo plectonémico como toroidal (figura 1-8), mientras que en la cromatina, la tensión se produce principalmente por la interacción DNA-histonas (superenrollamiento toroidal) (figura 1-9).

El nucleoide y la cromatina contienen, por tanto, el genoma del organismo; es decir, el DNA que contiene la información genética que lo define. El término cromosoma generalmente se refiere a una molécula de DNA del genoma. Las bacterias, en general, tienen su genoma en una sola molécula, o cromosoma; mientras que, en los eucariontes, el genoma se encuentra distribuido en varias moléculas de DNA o cromosomas.

En los eucariontes, la información genética está en varias moléculas lineales de DNA presentes en la cromatina.

El genoma de los eucariontes se localiza en un complejo molecular de DNA, RNA y proteínas, conocido como cromatina. El DNA de la cromatina, que en las células humanas se encuentra en 23 pares de moléculas lineales o cromosomas diferentes, tiene una longitud total de más de 1 metro. En las células de humano, como en las células de todos los eucariontes, además del DNA del núcleo, hay moléculas adicionales de DNA en organelos como son las mitocondrias y los cloroplastos.

Cada cromosoma tiene un centrómero, dos telómeros y varias regiones de inicio para la replicación. Los centrómeros son regiones generalmente compuestas de secuencias pequeñas repetidas, que unen a las cromátidas hermanas al huso cromático durante la mitosis. Los telómeros son secuencias que se localizan en los extremos de cada cromosoma. Estas secuencias son muy importantes para la replicación de moléculas lineales de DNA.

Los cromosomas son unidades dinámicas cuya apariencia varía con la etapa del ciclo celular. Durante la interfase, cuando el DNA se transcribe y se replica, los cromosomas de la mayoría de las células forman una malla nuclear dispersa donde no es posible identificar a cada cromosoma. En la fase de mitosis, los cromosomas forman estructuras más compactas que se unen al huso cromático donde es posible identificar a cada par de cromosomas.

Estas moléculas de DNA tan largas se encuentran organizadas dentro de las células en estructuras muy compactas, de manera que ocupan el volumen comparativamente pequeño del núcleo. A continuación, se describen brevemente los diferentes niveles de organización molecular del DNA en la cromatina.

El primer nivel de condensación del DNA se da por la interacción del DNA con unas proteínas básicas llamadas histonas. En general, las proteínas de la cromatina se dividen en tres clases principales: a) histonas nucleosomales: H2A, H2B, H3 y H4; b) histonas internucleosomales o H1, y c) proteínas no histonas. Las histonas tienen una gran proporción de residuos de aminoácidos con carga positiva como arginina y lisina, lo que permite su enlace electrostático al DNA cargado negativamente. Las no histonas comprenden un número grande de clases diferentes de proteínas; sin embargo, en la cromatina se encuentran en menor proporción que las histonas. Estas proteínas son importantes para regular la expresión genética y para organizar a la cromatina.

Las histonas nucleosomales se organizan en una estructura octamérica que contiene dos copias de cada histona. Este octámero forma un centro alrededor del cual el DNA se enrolla de manera toroidal (dos vueltas de 83 pb), para generar unidades discretas conocidas como nucleosomas (figura 1-9) (Luger y cols., 1997). Los nucleosomas están unidos entre sí por puentes de 20 a 80 pb, para formar lo que se conoce como "collar de perlas" o fibra de 10 nm (figura 1-9). En un segundo nivel de condensación, la histona H1 (y otras proteínas de tipo no histona) se enlaza al DNA que une a cada nucleosoma, generando una estructura helicoidal de 30 nm de diámetro o solenoide. Cada vuelta de un solenoide contiene seis nucleosomas con una molécula de H1 asociada a cada unidad nucleosomal (figura 1-9). Posteriormente, esta fibra se enrolla sobre sí misma para formar una fibra más gruesa de cromatina, la que, a su vez, se organiza en asas (figura 1-9). Actualmente, aunque aún se desconoce mucho de la organización de la cromatina, se empieza a entender la organización de las fibras de solenoides y de las asas, durante la interfase y la mitosis. Si los cromosomas metafásicos (mitosis) se tratan con detergentes polianiónicos, se desprende la mayoría de las proteínas del DNA y se observa que la cromatina se descondensa y forma asas enormes de aproximadamente 60 kb de DNA. Estas asas se encuentran unidas a una estructura proteica o esqueleto cromosomal cuya principal proteína es la enzima topoisomerasa II. Las secuencias de DNA que se unen a este esqueleto o SAR, son relativamente resistentes a enzimas que degradan al DNA o DNAsas. Algunas secuencias SAR de *Drosophila* se unen de manera específica a la topoisomerasa II, lo cual podría explicar el anclaje de las asas de DNA al esqueleto cromosomal (Marsden y Laemmli, 1979; Mirkovitch y cols., 1984). Se ha propuesto también la presencia de un esqueleto proteico, menos definido, en el núcleo interfásico. Esta estructura, conocida como matriz nuclear, parece ser importante para mantener la organización de los cromosomas dentro del núcleo. Como en el caso de los cromosomas metafásicos, las fibras de DNA de la cromatina de la célula en interfase parecen estar unidas a la matriz nuclear a través de secuencias específicas o MAR (Manuelidis, 1990).

En resumen, en oposición al concepto previo de un DNA prácticamente "desnudo" en las bacterias y a un DNA recubriendo a las proteínas en los eucariontes, actualmente se considera que el DNA en todas las células se organiza como cromatina; es decir, como una estructura compacta y dinámica formada de moléculas de DNA, proteína y RNA. Esta estructura compacta tiene, sin embargo, la plasticidad suficiente para que se lleven a cabo las funciones esenciales del DNA: replicación, reparación, recombinación, transposición y segregación del genoma, así como para permitir la expresión regulada de la información genética.



Referencias generales

Lewin, B., *Genes VII,* Oxford University Press Inc., Nueva York, 2000.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. y Darnell, J., *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman and Company, Nueva York, 2000.

Mathews, C.K.; Van Holde, K.E. y Ahern, K.G., *Biochemistry,* 3a. ed., Addison Wesley Longman, Inc., San Francisco, California, 2000.

Nelson, D.L. y Cox, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry,* 3a. ed., Worth Publishers, Nueva York, 2000.



Referencias bibliográficas

Adams, M.D. y cols., "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*", *Science,* **287:** 2185-2195, 2000.

Allewell, N., "Why does DNA bend?", *Trends in Biochem. Sci.,* **13:** 193-195, 1988.

Blattner, F.R. y cols., "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12", *Science,* **277:** 1453-1462, 1997.

Bult, C.J. y cols., "Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*", *Science,* **273:** 1058-1073, 1996.

Curtis, H. y Barnes, N.S., "From an Abbey garden: the begining of Genetics", en *Biology,* 5a. ed., Worth Publishers, Inc., Nueva York, 235-248, 1989.

Fleischmann, R.D. y cols., "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*", *Science,* **269:** 496-512, 1995.

Goffeau, A. y cols., "Life with 6000 genes", *Science,* **274:** 546-567, 1996.

Gómez-Eichelmann, M.C. y Camacho-Carranza, R., "El nucleoide bacteriano", *Rev. Lat. Amer. Microbiol.,* **37:** 281-290, 1995.

———, "Superenrollamiento del DNA y topoisomerasas de *Escherichia coli*", *Rev. Lat. Amer. Microbiol.,* **37:** 291-304, 1995.

Jeffreys, A.J.; Wilson, V. y Thein, S.L., "Individual-specific 'fingerprints' of human DNA", *Nature,* **316:** 76-79, 1985.

Kaul, S. y cols., "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*", *Science,* **408:** 796-815, 2000.

Luger, K.; Mäder, A.W.; Richmond, R.K.; Sargent, D.F. y Richmond, T.J., "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution", *Nature,* **389:** 251-260, 1997.

Manuelidis, L., "A view of interphase chromosomes", *Science,* **250:** 1533-1540, 1990.

Marsden, M. y Laemmli, U.K., "Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model", *Cell,* **17:** 849-858, 1979.

McPherson, J.D. y cols., "A physical map of the human genome, *Nature,* **409:** 934-941, 2001.
Mirkovitch, J.; Mirault, M.E. y Laemmli, U.K., "Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold", *Cell,* **39:** 223-232, 1984.
Nordheim, A.; Lafer, E.M.; Peck, L.J.; Wang, J.C.; Stollar, B.D. y Rich, A., "Negatively supercoiled plasmids contain left-handed Z-DNA segments as detected by specific antibody binding", *Cell,* **31:** 309-318, 1982.
Pérez-Martín, J.; Rojo, F. y De Lorenzo, V., "Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression", *Microbiol. Rev.,* **58:** 268-290, 1994.
Rich, A., "DNA comes in many forms", *Gene,* **135:** 99-109, 1993.
Venter, J.C. y cols., "The sequence of the human genome", *Science,* **291:** 1304-1351, 2001.
Wang, A.H.J.; Quigley, G.J.; Kolpak, F.J.; Crawford, J.L.; Van Boom, J.H.; Van der Marel, G. y Rich, A., "Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution", *Nature,* **282:** 680-686, 1979.
Watson, J.D. y Crick, F.H.C., "Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid", *Nature,* **171:** 737-738, 1953.
————, "Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid", *Nature,* **171:** 964-969, 1953.
Wittig, B.; Dorbic, T. y Rich, A., "The level of Z-DNA in metabolically active, permeabilized mammalian cell nuclei is regulated by torsional strain", *J. Cell Biol.,* **108:** 755-764, 1989.
Zhuang, S.; Lockshin, C.; Herbert, A.; Winter, E. y Rich, A., "Zuotin, a putative Z-DNA binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*", *EMBO J.,* **11:** 3787-3796, 1992.

CAPÍTULO 2

ÁCIDO RIBONUCLEICO, RNA

Jesús Cortés Hermosillo



Introducción

El RNA es una molécula prebiótica que existe desde hace aproximadamente 3.8 millones de años. Los estudios iniciales sobre el RNA se remontan a la década de 1940 y, gracias a la utilización de diversas metodologías moleculares que incluyen transcripción *in vitro,* secuenciación y expresión *in vivo* e *in vitro,* así como cristalografía de RNA entre otras, ha sido posible definir que el RNA es una macromolécula polinucleotídica de una sola cadena, que sigue una dirección en sentido 5' a 3', y se encuentra constituida por elementos químicos conocidos como bases nucleotídicas, que son del tipo de la adenina, citosina, guanina y uracilo, así como por azúcar ribosa.

El RNA es una macromolécula polinucleotídica de una sola cadena, que sigue una dirección en sentido 5' a 3', y se encuentra constituida por elementos químicos conocidos como bases nucleotídicas, que son del tipo de la adenina, citosina, guanina y uracilo, así como por azúcar ribosa.

Se han identificado fundamentalmente tres grandes clases de RNA, el RNA mensajero (mRNA), el cual representa de 3 a 5% del RNA total celular, el RNA de transferencia (tRNA), con un porcentaje de 5 a 7% del RNA total celular, el RNA ribosomal (rRNA), que es el más abundante y cuyo porcentaje de RNA total celular oscila entre 85 a 90%; adicionalmente, un grupo de RNA pequeños que pueden ser detectados en 1% del RNA total celular; estos últimos pueden ser de localización nuclear (snRNA), nucleolar (snoRNA) y citoplásmica (scRNA).

Ha sido comprobado que los RNA son resultado de la copia o transcripción de un DNA genómico que sirve como molde; esta copia es mediada en sistemas procariontes por la acción de una enzima, la RNA polimerasa, en tanto que en sistemas eucariontes participan tres clases diferentes de RNA polimerasas, las cuales sintetizan las diferentes clases de moléculas de RNA; además, existen complejos moleculares de RNA que muestran una función catalítica; estos complejos se conocen como ribozimas.

En sistemas eucariontes participan tres clases diferentes de RNA polimerasas, las cuales sintetizan las diferentes clases de moléculas de RNA.



Características genéricas del RNA

Basándonos en la estructura del RNA, se puede apreciar que éste es químicamente muy similar al DNA y contiene clásicamente cuatro tipos de nu-

cleótidos unidos por enlaces fosfodiéster en dirección 3'- 5'. Dos diferencias existen en la composición química entre el DNA y el RNA; la primera es que el azúcar constitutivo del DNA es la desoxirribosa, en tanto que el RNA contiene ribosa, la cual, a su vez, contiene un grupo hidróxilo (OH) adicional; la segunda diferencia es que el RNA no contiene la base nucleotídica timidina y, en su lugar, posee la base nucleotídica uracilo. A diferencia del DNA que es una doble cadena, el RNA generalmente es de una sola cadena, a excepción hecha por la estructura secundaria propia del RNA, la cual permite la formación de dobles cadenas por interacciones nucleotídicas o apareamiento de bases intracadena (Abrahams y cols., 1990; Antao y cols., 1991) (figura 2-1).

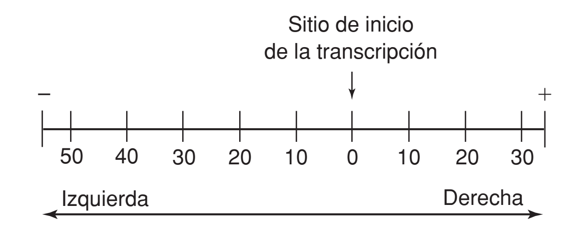
A diferencia del DNA que es una doble cadena, el RNA generalmente es de una sola cadena.

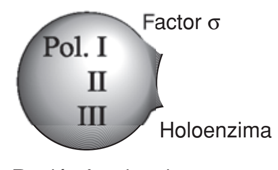
Figura 2-1. Estructura general de RNA.



Características estructurales y funcionales de las RNA-polimerasas en sistemas procarionte y eucarionte

El proceso de la transcripción de los organismos procariontes está relacionado con un solo tipo de RNA-polimerasa, la cual es responsable de la síntesis del mRNA, rRNA y tRNA. Esta RNA-polimerasa se encuentra formada por dos regiones, la región funcional de la enzima (sitio activo de la enzima), constituida por cuatro subunidades, dos de tipo α, una de tipo β y una β'; la otra región es denominada factor σ, constituida por una sola subunidad denominada σ. El enlace de estas dos regiones (la región funcional o sitio activo y el factor σ) constituye la enzima completa denominada también holoenzima; sólo la enzima completa puede iniciar la transcripción. El factor σ es un factor proteico que se une al DNA en aproximadamente 50 a 80 nucleótidos, los cuales están localizados hacia la izquierda del sitio de inicio de la transcripción. La región funcional de la enzima también se une al DNA en aproximadamente 30 a 50 nucleótidos o pares de bases, localizados tanto hacia la izquierda como a la derecha del sitio de iniciación. Un elemento importante de la transcripción lo constituye el promotor, generalmente localizado hacia la izquierda del sitio de iniciación, en la región de –10 a –35 y está constituido por secuencias altamente conservadas en la región –10, denominada caja TATAAT, y en la región –35 conocida como caja TTGACA, así como el sitio propiamente de iniación de la transcripción; la RNA-polimerasa se mueve a lo largo del molde de DNA y sintetiza RNA, hasta que encuentra una secuencia específica de terminación (Losick y Chamberlin, 1976; Siebenlist y cols., 1980) (figura 2-2).





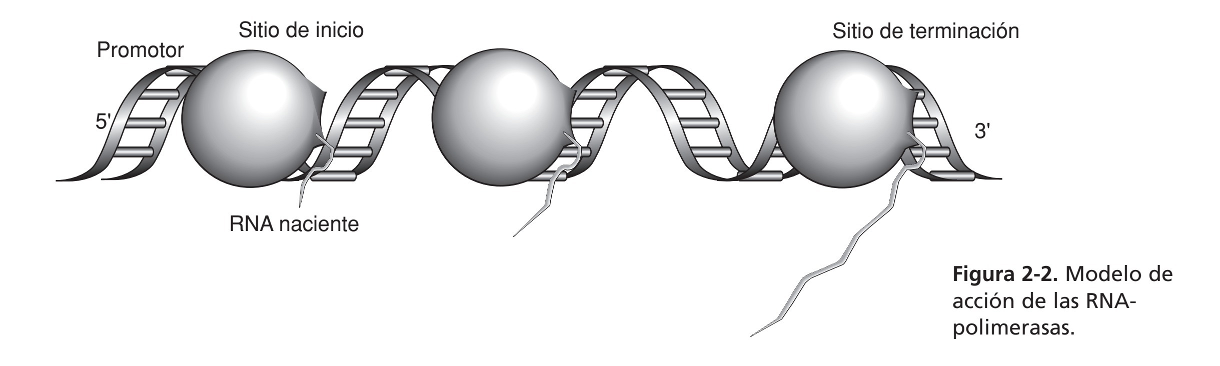


Figura 2-2. Modelo de acción de las RNA-polimerasas.

Las diferentes clases de RNA en sistema eucarionte son sintetizadas a partir del DNA genómico por medio del proceso de expresión genética denominado transcripción, el cual es la generación de una sola cadena de RNA idéntica a una de las cadenas del DNA. El mecanismo de la transcripción se realiza por acción específica de las RNA-polimerasas I, II y III; estas enzimas se localizan en diferentes compartimentos celulares y cada una de ellas transcribe las distintas clases de moléculas de RNA.

La organización del DNA genómico incluye secuencias específicas denominadas promotores, sitios de iniciación, motivos, sitios de amplificación, secuencias específicas de transcripción hacia la izquierda o a la derecha del sitio de iniciación, así como sitios de terminación de la transcripción.

La RNA-polimerasa I se encuentra localizada en el nucleolo y su producto de transcripción es el pre-rRNA.

La RNA-polimerasa I se encuentra localizada en el nucleolo y su producto de transcripción es el pre-rRNA. Su complejo de iniciación requiere de la identificación de dos regiones genómicas específicas, la primera identificada como promotor central se localiza en la región –45 a +20, e incluye el sitio de iniciación de la transcripción, la segunda corresponde a la región de control ubicada hacia la izquierda del sitio de iniciación, entre –170 y –110 pares de bases; inicialmente, la RNA-polimerasa I interactúa con estas dos regiones, seguida de la adición de un factor proteico, denominado UBFI, que estabiliza la interacción, lo que permitirá la agregación del factor proteico adicional identificado como SLI; está compuesta de 4 subunidades, a la vez que incluye la proteína de enlace a la caja TATA (TBP). Esto, cooperativamente con el factor UBFI, estimulará el inicio de la transcripción del transcrito primario del pre-rRNA, finalizando este proceso al identificarse las secuencias de terminación (Chambon, 1975; Dynlacht y cols., 1991; Moss y Stefanovsky, 1995; Paule, 1994; Sollner-Webb y Tower, 1986) (figura 2-2).

La RNA-polimerasa II participa en la transcripción del pre-mRNA o RNA heterogéneo nuclear (hnRNA) y de algunos tipos de pequeños RNA.

La RNA-polimerasa II participa en la transcripción del pre-mRNA o RNA heterogéneo nuclear (hnRNA) y de algunos tipos de pequeños RNA (U1, U2, U3, U4, U5, etc.); para que la RNA-polimerasa II pueda iniciar el proceso de síntesis de pre-mRNA, se requiere de factores auxiliares agrupados en el aparato de transcripción basal; estos elementos de control, localizados hacia la izquierda del sitio de iniciación, son denominados caja TATA, caja CAAT y TAF, entre otros. Estos elementos hacia la izquierda del sitio de iniciación deben interactuar inicialmente con factores proteicos que dan comienzo al proceso de la transcripción, conocidos como TBP (proteínas de unión al promotor), TAF (factores asociados a TBP), TF II A, TF II B (factores de transcripción de RNA-polimerasa II) y el TF II F que funciona como helicasa, lo que permite el ensamblaje molecular de todos estos factores con la doble cadena de DNA y favorecen la llegada de la RNA-polimerasa II. Este gran complejo molecular así formado es estabilizado por un último factor, el TF II E, permitiendo el inicio de la síntesis del pre-mRNA (Conaway y Conaway, 1993; Ossipow y cols., 1995; Reinberg y Roeder, 1987; Usheva y Shenk, 1994; Zawel y Reinberg, 1995; Young, 1991) (figura 2-2).

La RNA-polimerasa III participa en la transcripción del pre-tRNA.

La RNA-polimerasa III participa en la transcripción del pre-tRNA; característicamente, el DNA posee su secuencia específica promotora internamente, es decir, hacia la derecha del sitio de iniciación, y hacia la izquierda

del sitio de iniciación se identifican las cajas A, B y C. También existen regiones específicas como la caja TATA, PSE y OCT; en este tipo de síntesis de RNA, se requiere de la participación de factores proteicos adicionales denominados TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC, los cuales permitirán la acción de la RNA-polimerasa III, para el inicio de la síntesis de los pre-tRNA. La RNA-polimerasa III participa también en la transcripción de algunos tipos de pequeños RNA (U6, 7SK, 8-2, 7SL, Y1-5, etc.), los cuales poseen su promotor de transcripción hacia la izquierda del sitio de iniciación y son denominados secuencias TATA, PSE y OCT; particularmente, la secuencia TATA requiere la unión del factor proteico TBP, que permitirá el posicionamiento correcto de la RNA-polimerasa III, en el sitio de iniciación de esta clase de moléculas de RNA (Choy y Green, 1993; Gabrielsen y Sentenac, 1991; Geiduschek y Tochini-Valentini, 1988; Geiduschek y Kassvetis, 1992; Platt, 1986) (figura 2-2).



El RNA mensajero (mRNA) y su procesamiento

El mRNA varía en tamaño y composición de bases; el orden de éstas refleja con precisión la información codificada en la secuencia del DNA genómico; representa de 3 a 5% del RNA total celular; por otra parte, el tamaño del mRNA depende del tamaño del gen transcrito.

Por las características propias de las células procariontes, el mRNA es transcrito y traducido en el mismo compartimento; estos mRNA codifican para varias proteínas, por lo que característicamente son policistrónicos en su región terminal 5'; se encuentra un grupo trifosfato y la región terminal 3' corresponde a la última base del mRNA; este tipo de moléculas de mRNA tiene una vida media de aproximadamente 5 min. Por otra parte, este tipo de mRNA posee dos codones codificables que representan la secuencia de aminoácidos que será traducida; antes del codón de iniciación existe un segmento de polipurinas conocido como de Shine-Dalgarno (el cual es exclusivo de células procariontes; por tanto, no existe en células eucariontes), seguido del codón de iniciación AUG y el codón de terminación UAA; además, por ser moléculas policistrónicas, poseen regiones intercistrónicas no codificantes; algunas células procariontes no poseen regiones intercistrónicas, sino que la traducción de este tipo de mRNA, también policistrónico, está regulado por aspectos conformacionales y de estructura secundaria de los mRNA.

El mRNA de células eucariontes es de tipo monocistrónico, es decir, codifica para una sola proteína; es sintetizado en el núcleo y requiere de ser transportado al citoplasma para su traducción. Característicamente, posee en su región terminal 5' una caperuza (*cap*) metilada que puede ser monometilada o hipermetilada. En este proceso de metilación participan diferentes enzimas, como pueden ser la guanina-7-metil-transferasa y la 2'-O-metil-transferasa, entre otras. En la región terminal 3', el mRNA posee una cadena o tallo de poli(A) de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, la cual no es codificada por el DNA, pero su adición se debe a la acción de la poli(A)-polimerasa; el tallo de poli-A se asocia con su proteína de enlace,

la ABP. La cadena de poli(A) le confiere estabilidad al mRNA, permitiendo que éste pueda tener una vida media promedio de aproximadamente 4 horas (Gallie, 1991; Nevins, 1983; Sachs, 1993; Takgaki y cols., 1988; Whale y Keller, 1992; Wickens, 1990a, 1990b).

El procesamiento del pre-mRNA ocurre en el nucleoplasma y requiere de la participación de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP).

El procesamiento del pre-mRNA, que involucra el corte y unión de regiones codificantes denominadas exones y la eliminación de secuencias no codificantes o intrones (*splicing*), se realiza en la unidad catalítica denominada espliceosoma.

El procesamiento del pre-mRNA ocurre en el nucleoplasma y requiere de la participación de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP); una de las actividades principales que se llevan a cabo en el nucleoplasma de las células eucariontes es la síntesis, el procesamiento, el transporte y la exportación al citoplasma del mRNA maduro. El procesamiento del pre-mRNA, que involucra el corte y unión de regiones codificantes denominadas exones y la eliminación de secuencias no codificantes o intrónicas (*splicing*), se realiza en la unidad catalítica denominada espliceosoma, la cual está constituida por la interacción coordinada de un grupo de snRNP que contiene al menos cinco RNA pequeños nucleares (snRNA U1, U2, U4/U6 y U5), los cuales son ayudados por la participación de múltiples factores proteicos. La reacción de *cis-splicing* ocurre por un mecanismo de dos pasos: el primero involucra un ataque nucleofílico en la región del sitio de corte 5', por interacción específica hidroxílica 2' de un residuo de adenosina cercano a la región terminal 3' del intrón, lo que origina la liberación del exón 1 y un producto intermedio formado por el intrón-exón 2; en el segundo paso, los dos exones son unidos por medio de un ataque nucleofílico, del radical hidróxilo libre 3' del exón 1, al sitio de corte de la región 3, permitiendo que el intrón sea liberado y las secuencias exónicas se encuentren unidas; debido a estos mecanismos de procesamiento, se liberan las secuencias intrónicas no codificantes en un complejo denominado lazo (*lariat*) (Reed y Maniatis, 1985; Sharp, 1985 y 1994) (figura 2-3).

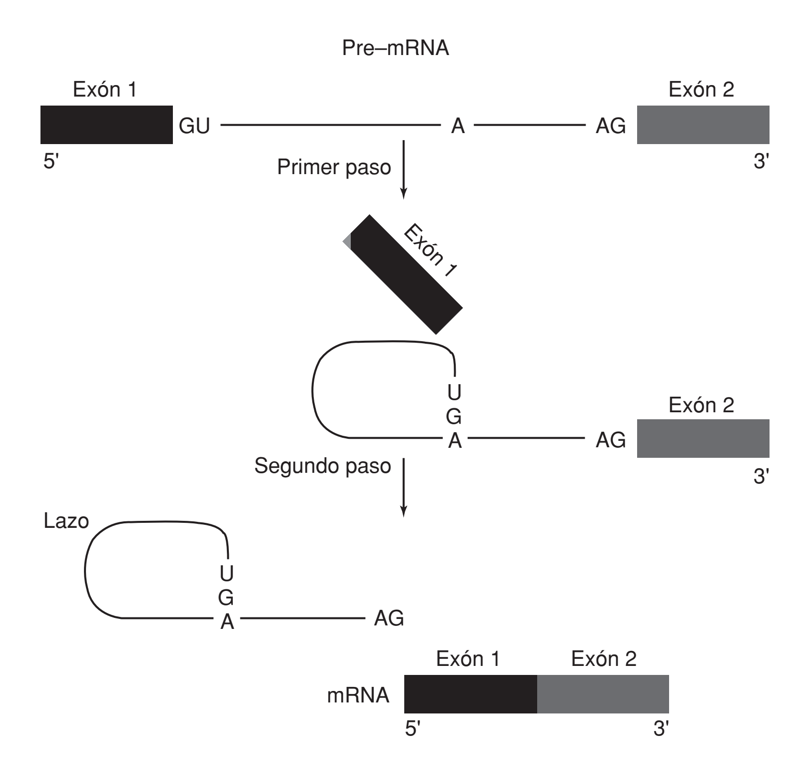


Figura 2-3. Procesamiento del pre-mRNA *cis-splicing*.

Interacciones filogénicamente conservadas, que involucran apareamiento de bases entre el pre-mRNA y los snRNA, han permitido definir que U1 y U5 snRNA están involucrados en el reconocimiento del sitio de corte en la región 5' y 3', en el procesamiento del pre-mRNA; así mismo, con el U2 snRNA ha sido posible demostrar un apareamiento de bases con el sitio de separación (*branch*) del pre-mRNA; este tipo de interacciones RNA-RNA ocurre vía apareamiento de bases, fundamentalmente del tipo clásico de Watson y Crick (Cortés y cols., 1993; Madhani y Guthrie, 1992; Newman y Norman, 1991; Zhuang y Weiner, 1986).



El RNA ribosomal (rRNA) y su procesamiento

El rRNA, en cualquier organismo, no presenta variación entre los diferentes tejidos; es uniforme en tamaño y composición de bases; su secuencia no es representativa de los genomas que se le asocian; por tanto, el rRNA es informativo y conformacional, además de que existen múltiples pruebas génicas y bioquímicas que señalan que el rRNA es un elemento fundamental en el mecanismo de la traducción, ya que esta clase de RNA son elementos constitutivos y conformacionales de los ribosomas. En el sistema procarionte se han descrito el rRNA 23S, 16S y 5S; en tanto que las células eucariontes contienen el rRNA 28S, 18S, 5.8S y 5S, éstos son inicialmente transcritos por la RNA-polimerasa I, a partir de una misma molécula precursora, a excepción del rRNA 5S, que es transcrito separadamente por la RNA-polimerasa III. Los rRNA representan al menos las dos terceras partes del RNA celular total (Bronwnlee y cols., 1968; Brosius y cols., 1978; Brosius y cols., 1980; Noller, 1984).

> En el sistema procarionte se han descrito el rRNA 23S, 16S y 5S; en tanto que las células eucariontes contienen el rRNA 28S, 18S, 5.8S y 5S.

El rRNA transcrito primario en eucariontes tiene una longitud aproximada de 13 kb, el cual es sometido a procesamiento para obtener las diferentes moléculas de rRNA, que serán transportadas al citoplasma y, con la participación de múltiples factores proteicos, favorecer el autoensamblaje de la maquinaria catalítica proteica citoplásmica conocida como ribosoma (Noller, 1991).

Los transcritos primarios de rRNA están constituidos por una región 5', que se identifica como espaciador transcrito externo 5' (ETS5') y se encuentra junto a la región genómica que codifica para el rRNA 18S; inmediato a éste, se encuentra el sitio denominado espaciador transcrito interno 1 (ITS1), la región correspondiente al 5.8S, seguido del ITS2, el sitio de la región del rRNA 28S y, finalmente, una región ETS 3'. Los sitios precisos de corte, tanto en la región 5' como en la 3' del rRNA, se pueden apreciar en la figura 2-4, donde, en forma ordenada y por una secuencia de episodios de procesamiento del transcrito primario de rRNA, se obtienen los productos finales que corresponden al rRNA 28S, 18S y 5.8S (figura 2-4). Este episodio ocurre en el nucleolo, ya que en él se encuentran, entre otros, un conjunto de DNA ribosomales, transcritos de rRNA, productos intermedios del procesamiento de rRNA, ribosomas en formación y un grupo de complejos RNA-proteína conocidos como sno-RNP; estos sno-RNP son esenciales para el procesamiento del transcrito primario de rRNA, e interactúan vía apareamiento de bases,

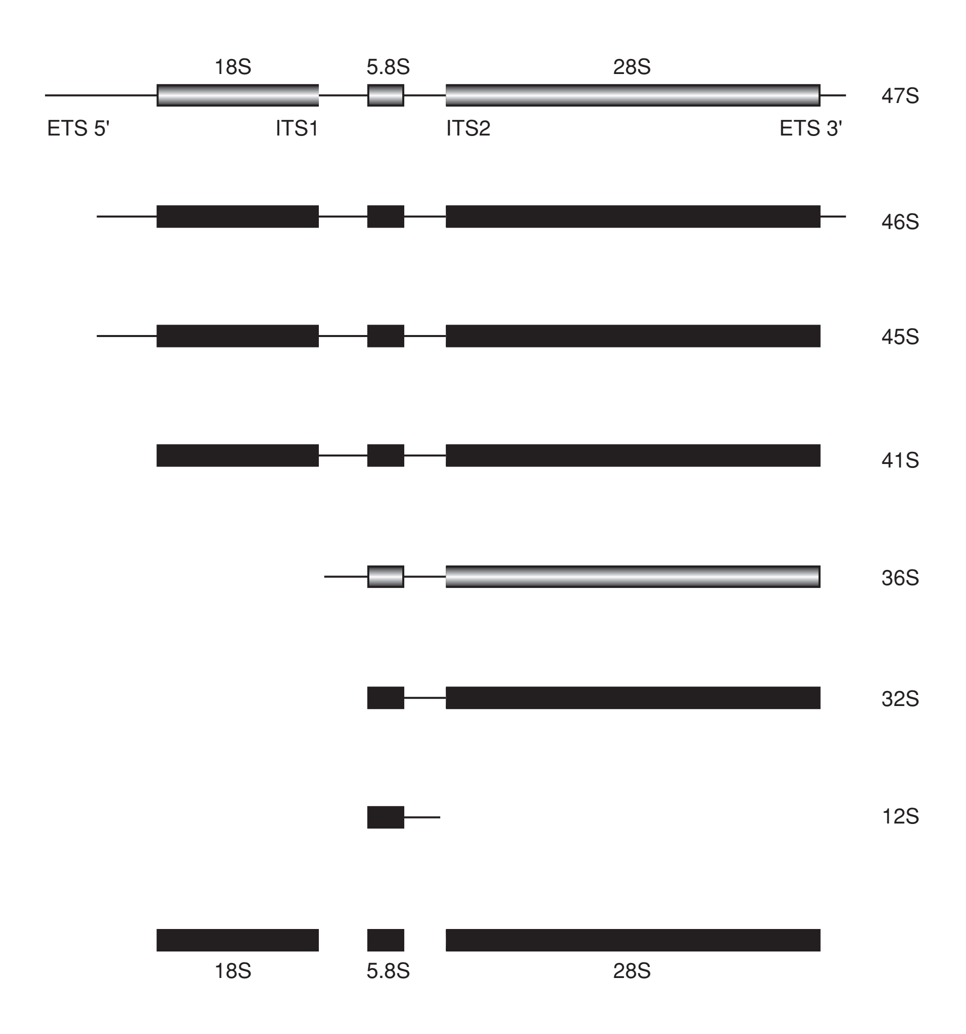


Figura 2-4. Procesamiento del pre-rRNA en sistema eucarionte.

tanto con los ETS como con los ITS; una descripción detallada de la acción específica de las snoRNP se revisará líneas más adelante (Bowman y cols., 1981, 1983; Hannon y cols., 1989; Peculis y Steitz, 1993; Shumard y Eichler, 1988; Sollner-Webb y cols., 1993).



El RNA de transferencia (tRNA) y su procesamiento

Los RNA de transferencia poseen una longitud en su cadena que varía de 72 a 95 nucleótidos, lo que los convierte en los RNA más pequeños. La principal función para esta clase de moléculas de RNA es la de activar aminoácidos durante la síntesis de proteínas.

Los RNA de transferencia poseen una longitud en su cadena que varía de 72 a 95 nucleótidos, lo que los convierte en los RNA más pequeños. La principal función para esta clase de moléculas de RNA es la de activar aminoácidos durante la síntesis de proteínas. Para realizar esta función, dos regiones de los tRNA son importantes: el anticodón que interactúa con el codón del mRNA y la región aceptora terminal 3'. La estructura secundaria clásica de un tRNA 3' y la región aceptora tienen una forma de trébol y poseen tres brazos, cada uno de los cuales consiste en un anillo de una sola cadena, formado por apareamiento de bases (denominados tallos); uno de estos brazos corresponde a la región del anticodón que interactúa, vía apareamiento de

bases, con el codón del mRNA. Poseen en su extremo terminal 3' la región aceptora terminal o de interacción específica con el aminoácido; así, podemos señalar que el tRNA se une a un solo aminoácido, al cual se une covalentemente; cuando esto ocurre, a este complejo molecular se le denomina aminoacil-tRNA; existe al menos un tRNA para cada aminoácido. Por tanto, los tRNA son aminoácidos específicos, por lo que su nomenclatura llevará la abreviación de tres letras del aminoácido de que se trate; así, por ejemplo, el tRNA para el aminoácido metionina se representa como $tRNA^{Met}$; el mecanismo del enlace covalente del tRNA con el aminoácido específico es catalizado por la enzima aminoacil-tRNA-sintetasa, de la que existen, al menos, 20 tipos diferentes (Holley y cols., 1965; Moras, 1992; Söll y cols., 1966).

En los distintos compartimentos celulares pueden existir tRNA; así, los cloroplastos y mitocondrias de mamíferos contienen sus propios tRNA, los cuales son diferentes a los citoplásmicos, en tanto que las mitocondrias de plantas poseen tRNA que son de origen nuclear (Steinberg y cols., 1993).

En bacterias, los tRNA proceden de grandes moléculas precursoras o transcritos primarios, los cuales pueden incluir hasta 21 moléculas de tRNA, en tanto que, en el sistema eucarionte, los transcritos primarios parecen ser monoméricos y los promotores para la transcripción de esta clase de moléculas por la RNA-polimerasa III se encuentran localizados internamente en el gen del tRNA. Algunos transcritos primarios de tRNA contienen intrones, por lo que algunas exo y endonucleasas son requeridas para la eliminación de las secuencias intrónicas y con el fin de contar con transcritos de tRNA maduros, además de este mecanismo de maduración del tRNA; el proceso de edición de RNA parece estar fuertemente involucrado en la generación de diversidad de las clases de moléculas de tRNA, y así, en algunos casos de eucariontes superiores (genoma de la rata), contar con al menos 10 genes que codifican para el $tRNA^{Asp}$, mostrando algunos de ellos cambios en la secuencia nucleotídica, cambios nucleotídicos que fueron generados postranscripcionalmente. Esto nos indica que el proceso de edición de RNA participa en forma determinante (Muto y cols., 1990).

Una característica adicional de los tRNA es que poseen un alto contenido de nucleótidos modificados o distintos químicamente a la adenina, citosina, guanina y uracilo; la presencia de estos nucleótidos modificados parece tener relación evolutiva, ya que en los tRNA de humanos se puede encontrar hasta en 25% de bases modificadas, en tanto que en bacterias existe menos porcentaje de variación. El papel funcional de estos nucleótidos modificados no es claro; sin embargo, han sido implicados como elementos de control en el reconocimiento por el codón (Björk, 1992; Yokoyama y Nishimura, 1993).

La RNAsa P representa la primera vía catalítica real, demostrando que un RNA de aproximadamente 400 nucleótidos era un componente de la RNAsa P bacteriana y que éste podía cortar a su sustrato normal (el precursor del tRNA), en ausencia de su subunidad proteica de 14,000 kD. La RNAsa P está involucrada en la biosíntesis del tRNA, catalizando una remoción endonucleotídica de secuencias líder 5' de los precursores de tRNA (pre-tRNA), lo que genera tRNA 5' maduros; en cada célula y en cada compartimento subcelular eucarionte donde se sintetiza tRNA, ha sido posible

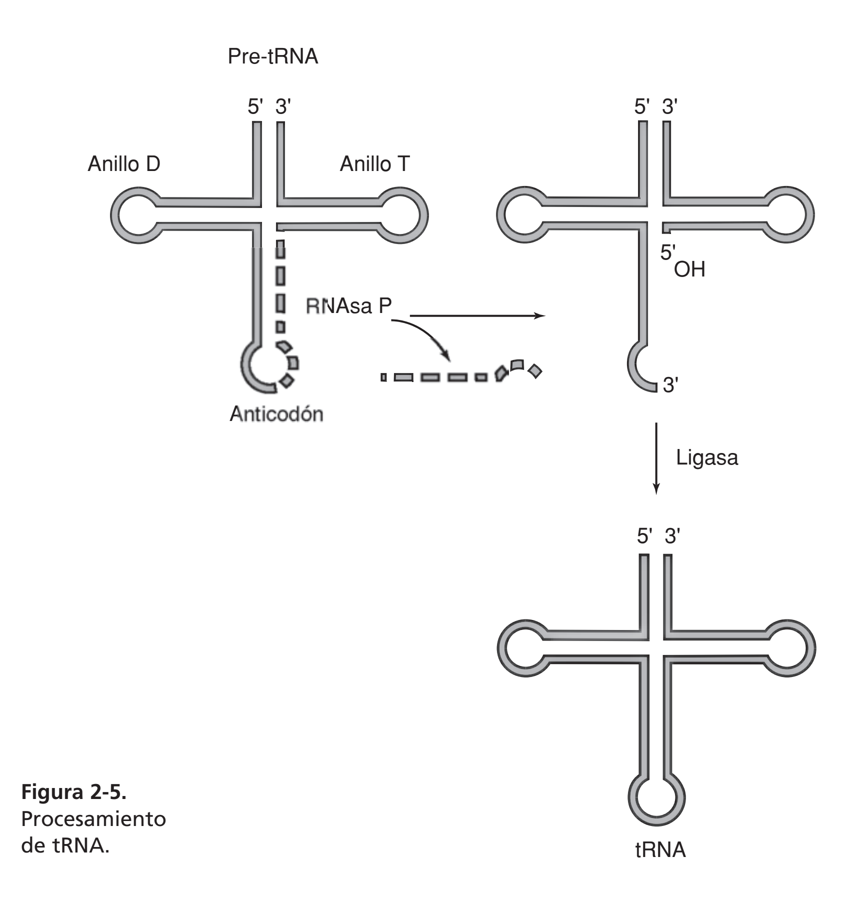


Figura 2-5. Procesamiento de tRNA.

identificar a la RNAsa P. Esta clase de enzimas ha sido aislada en bacterias, arqueas, levaduras, monos, ranas y humanos; posee dos regiones altamente conservadas, una localizada entre las posiciones nucleotídicas 61-74 y otra comprendida entre los nucleótidos 353-360 (Altman, 1990; Bartkiewicz y cols., 1989; Brown y Pace, 1992; Cech y cols., 1981; Guerrier-Takada y cols., 1983) (figura 2-5).



Los RNA pequeños nucleares (snRNA), nucleolares (snoRNA) y citoplásmicos (scRNA)

Los snRNA U1, U2, U4, U5, U6, U7, U11 y U12 se encuentran asociados con el grupo de proteínas Sm y cuentan con estructuras secundarias evolutivamente conservadas. Los snRNA son productos de la transcripción de la RNA-polimerasa II; poseen en su región 5' una caperuza, la cual es hipermetilada, del tipo 2,2,7,-trimetilguanosina (m3G); una excepción la constituye el U6 snRNA, que es sintetizado por la RNA-polimerasa III; éste posee una caperuza gamma-metilada. Todos los snRNA de clase Sm (excepto U6) poseen una región de cadena simple con secuencia similar y altamente conservada, que corresponde al sitio de enlace para las proteínas Sm. En verte-

brados, los snRNA son codificados por genes multicopia, en tanto que, en levaduras, los genes de una sola copia para este tipo de moléculas han facilitado el desarrollo de ensayos funcionales. La primera prueba experimental que involucró la participación de los snRNA en el mecanismo de procesamiento de pre-mRNA (*splicing*) fue la complementariedad de bases entre el snRNA U1 y el sitio de corte en la región 5' del pre-mRNA, e incluso interactúa con la región 3'; un aspecto similar ha sido demostrado con el snRNA U5. El análisis bioquímico de las interacciones moleculares que ocurren entre el snRNA U1 y U5 con las secuencias exónicas determina que ambos snRNA estén directamente relacionados en la selección del sitio de corte o procesamiento en la región 5' y 3' del pre-mRNA (Cortés y cols., 1993; Datta y Weiner, 1991; Lerner y cols., 1980; Newman y Norman, 1991; Reich y cols., 1992; Sharp, 1994).

El snRNA U7, también de clase Sm, es requerido para el procesamiento del pre-mRNA para histonas. El mRNA para histonas es ciclo celular-dependiente, producido por corte endonucleolítico, en el que participan dos elementos de cis-activación; el primero lo constituye una horquilla localizada antes del sitio de corte, mientras que el segundo está formado por una región de bases purínicas, generalmente localizada a no más de 17 nucleótidos después del sitio de corte, denominado HDE; la interacción vía apareamiento de bases del snRNA U7 con el HDE ha mostrado que este snRNA es esencial para el procesamiento del pre-mRNA para histonas (Bond y cols., 1991; Scharl y Steitz, 1994).

Recientemente se ha descrito que los snRNA U11 y U12 participan en el corte de secuencias intrónicas específicas, tanto de la región 5' como en el sitio intrónico y ramificación de algunos tipos de pre-mRNA en humanos (Wassarman y Steitz, 1984; Tarn y Steitz, 1995).

En mamíferos, los snoRNA U3, U8, U13, U14, U15, U16, U17, U18, U20, U21, U22, U23, U24, U25, U26, U27, U28 y U29 son precipitados por el anticuerpo fibrilarina (Fb); estos RNA de localización nucleolar poseen en su extremo terminal 5' una caperuza 2,2,7-trimetilguanosina (m3G). El análisis bioquímico de la estructura secundaria de los snoRNA ha permitido identificar dos regiones comunes, denominadas cajas C y D, sugiriendo que son sitios de unión para proteínas comunes. Diversos ensayos experimentales han definido que este tipo de snoRNA son requeridos para el procesamiento del transcrito primario de rRNA, interactuando directamente con el ETS o con el ITS, y participando en la remoción de secuencias no codificantes tanto en la región 5' como en el extremo terminal 3', ya sea del rRNA 28S, 18S o del 5.8S; este tipo de episodios de procesamiento de transcritos primarios de rRNA han sido descritos tanto en levaduras como en el sistema eucarionte superior (Baserga y cols., 1991; Li y cols., 1990; Savino y Gerbi, 1990; Tyc y Steitz, 1989; Tycowski y cols., 1993).

Los RNA citoplásmicos hY1, hY3, hY4 y hY5, asociados con el autoantígeno Ro de 60 kD, han sido adicionalmente identificados en el nucleoplasma, lo que ha permitido involucrarlos en el procesamiento del rRNA 5S; también han sido relacionados en transporte nucleo-citoplásmico; sin embargo, su papel funcional no está totalmente definido (O'Brien y Wolin, 1994; Wolin y Steitz, 1984).

Ribozimas

De manera convencional, los RNA con actividad catalítica fueron denominados ribozimas.

De manera convencional, los RNA con actividad catalítica fueron denominados ribozimas. Estos RNA tienen la capacidad intrínseca de realizar ruptura de enlaces y formar enlaces covalentes en reacciones que son teóricamente reversibles. En estas reacciones de catálasis, no se cuenta con la participación de proteínas, aunque son reacciones químicas dependientes de magnesio; en forma genérica, se puede decir que las ribozimas son RNA autocatalíticos o con capacidad de catálisis, por lo cual, podemos considerar al menos cuatro clases distintas de ribozimas o RNA catalíticos:

Los intrones autocatalíticos del grupo I, constituyeron los primeros RNA con actividad de ribozima descritos.

a) Los intrones autocatalíticos del grupo I, que constituyeron los primeros RNA con actividad de ribozima descritos; poseen una longitud aproximada de 413 nucleótidos, están presentes en rRNA, tRNA y genes que codifican para proteínas; han sido detectados en hongos, DNA mitocondrial, *Tetrahymena*, DNA de cloroplastos, bacteriófagos y eubacterias; su conservación evolutiva estructural fue definida por medio de comparaciones filogenéticas y características específicas que han sido confirmadas por ensayos de mutaciones y mapeo estructural *in vivo* e *in vitro*, lo que ha permitido definir que los intrones autocatalíticos del grupo I se encuentran constituidos por nueve dominios estructurales, denominados P1-P9, los cuales contienen los sitios de procesamiento 5' y 3'; asimismo, cuentan con una secuencia guía interna (IGS), la cual se encuentra localizada hacia adelante del sitio de procesamiento 5' y entre las secuencias del sitio de procesamiento exónico. El sitio de procesamiento 5' es definido por el apareamiento de bases entre el dominio estructural P1 y la IGS en el exón 5', en tanto que la región de procesamiento 3' se define por el apareamiento de bases entre P9 y la IGS, la cual involucra los dos nucleótidos que preceden la G terminal del intrón. Su mecanismo de acción para el procesamiento de intrones y exones involucra al RNA intrónico que se une al nucleótido guanosina, autocatalizándose a través de dos reacciones de transesterificación; en la primera, el grupo hidróxilo 3' terminal ataca al fosfato en el sitio de procesamiento 5', formando un enlace fosfodiéster 3' 5'. En la segunda reacción, el hidróxilo 3' de la región exónica 5' ataca al fósforo del sitio de procesamiento 3', autoliberándose la región intrónica; este grupo I de intrones autocatalíticos ha sido clasificado en cuatro grandes subgrupos que van del IA al ID (figura 2-6a) (Cech, 1990).

Los intrones autocatalíticos del grupo II han sido encontrados en algunos tipos de hongos, mitocondrias de plantas y en cloroplastos. Son particularmente interesantes debido a su posible relación evolutiva con los intrones del pre-mRNA, lo cual ha sido inicialmente sugerido por la descripción de similitudes en los mecanismos del corte, eliminación de intrones y unión de regiones exónicas en el procesamiento del pre-mRNA.

b) Los intrones autocatalíticos del grupo II han sido encontrados en algunos tipos de hongos, mitocondrias de plantas y en cloroplastos. Los intrones autocatalíticos del grupo II son particularmente interesantes debido a su posible relación evolutiva con los intrones del pre-mRNA, lo cual ha sido inicialmente sugerido por la descripción de similitudes en los mecanismos del corte, eliminación de intrones y unión de regiones exónicas en el procesamiento del pre-mRNA; el mecanismo de acción de los intrones autocatalíticos del grupo II ocurre de la siguiente manera: en primer lugar, ocurre que la unión intrón-exón 5' es procesada y la unión 2' 5' se establece con el residuo A de la región de procesamiento

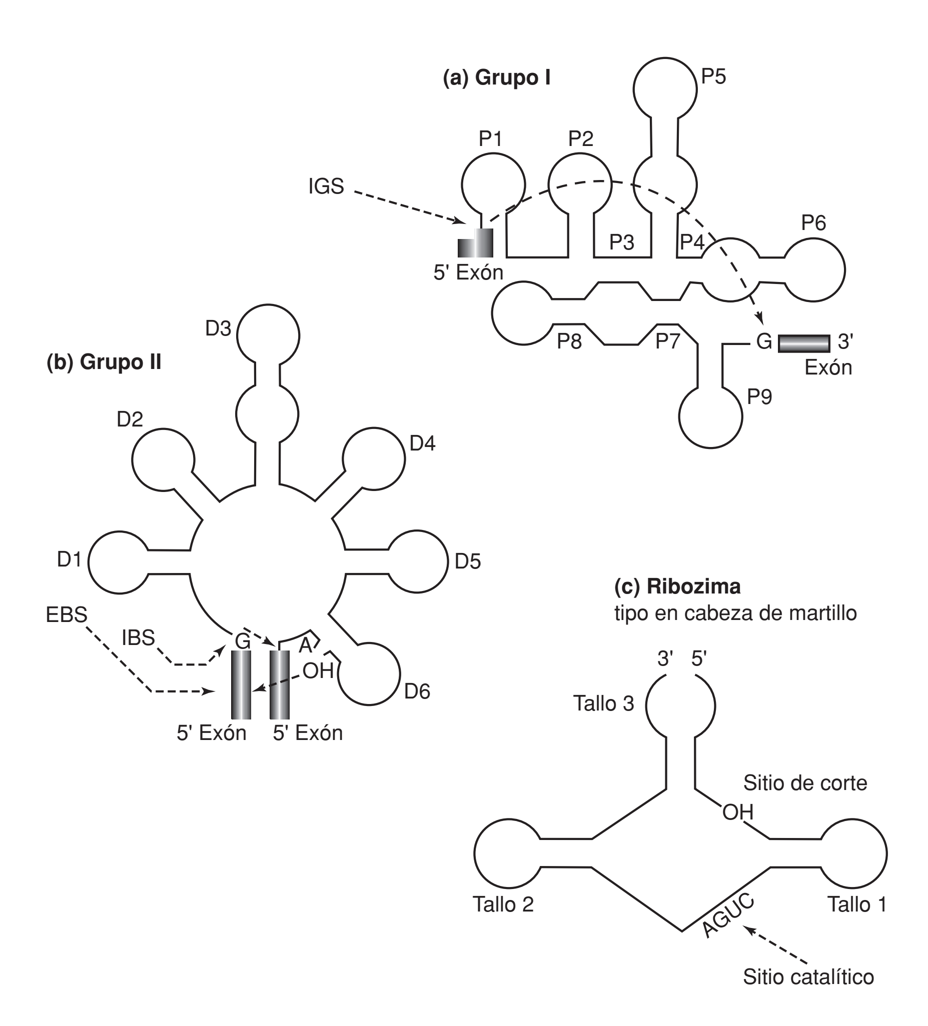


Figura 2-6. Clases de ribozimas.

3' y el primer nucleótido, generalmente una G de la región de procesamiento 5'; así, la unión 3' intrón-exón es procesada, permitiendo el enlace de los dos exones y liberando al intrón en forma de lazo. La definición de la estructura secundaria ha permitido conocer que los intrones autocatalíticos del grupo II poseen seis dominios estructurales denotados del 1 al 6, entre los que se ubican dos tipos importantes de regiones, una conocida como sitios de enlace al exón (EBS) y otra denominada sitio de enlace al intrón (IBS); la interacción y ataque nucleofílico entre estas dos regiones es muy similar a lo descrito para el procesamiento del pre-mRNA, en el que participan RNA pequeños de localización nuclear (U1, U2, U5 U2/U4 snRNA) (figura 2-6b) (Jacquier, 1990; Michel y cols., 1989).

c) Los dominios de RNA autocatalíticos; este grupo se encuentra integrado fundamentalmente por la clásica ribozima en *cabeza de martillo*; esta ribozima presenta una forma de Y e incluye en su conformación dos tallos (1 y 2), formando los brazos de la Y y un tercer tallo que constituye la base. La región catalítica de la ribozima contiene dos dominios estructurales, la secuencia consenso CUGA (nucleótidos en la posición C3-A6) y una repetición de secuencias GA; esta aparente simplicidad estructural

El dominio de RNA autocatalítico; se encuentra integrado fundamentalmente por la clásica ribozima en *cabeza de martillo*.

parece permitir su funcionamiento como enzima; la ribozima tipo en cabeza de martillo corta enlaces fosfodiéster, originando fosfatos cíclicos 2' 3' y una región hidroxílica 5' en una reacción que es dependiente de Mg^{2+} (figura 2-6c). Este tipo de ribozimas incluye fundamentalmente cuatro tipos: i) la clásica en cabeza de martillo, de aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, detectada en viroides de plantas y RNA satélites, y recientemente en bastantes generadas sintéticamente; ii) la de tipo horquilla, de aproximadamente 55 nucleótidos de longitud, encontrada en RNA satélites de plantas, así como también en múltiples de ellas generadas sintéticamente; iii) la delta de 85 nucleótidos de longitud, que fue detectada como un elemento de RNA en la hepatitis delta; y iv) *neurospora*, que representa un dominio de localización mitocondrial (Cheong y cols., 1990; Ruffner y cols., 1990).

d) El último grupo de ribozimas descritas y clasificadas hasta el momento corresponde al RNA de la RNAsa P, la cual, por estar involucrada en el procesamiento de los precursores del tRNA, fue descrita previamente, tal como se puede apreciar en la figura 2-5.

Otras clases de moléculas de RNA

La mayor parte del DNA genómico de organismos eucariontes se replica con base en una copia preexistente de un DNA precursor; en algunas ocasiones se ha copiado de RNA a DNA, y uno de estos componentes genómicos importantes es el DNA telomérico que, para su estabilidad, requiere de la participación de una enzima ribonucleoproteica, conocida como RNA o RNP-telomerasa. La RNA-telomerasa es en esencia una ribonucleoproteína transcriptasa reversa, en virtud de que adiciona DNA telomérico en los extremos terminales de los cromosomas eucariónticos. La telomerasa contiene como componente esencial un RNA. Es una transcriptasa reversa no clásica encontrada en un gran número de sistemas que incluye a los retrovirus, procariontes y eucariontes. La función biológica de la RNA-telomerasa fue inicialmente descrita en cromosomas eucariontes; sin ella, el cromosoma es inestable. El componente importante de la RNA-telomerasa lo constituye una secuencia de nueve nucleótidos (5'-CAACCCCAA-3'), complementaria con las secuencias repetidas teloméricas, sintetizadas por esta enzima. El mecanismo propuesto para la síntesis de DNA telomérico por la RNA-telomerasa consiste en cuatro pasos: 1, unión de la secuencia identificada como iniciadora con la secuencia telomérica, continuando la síntesis con el paso 2, o de polimerización, seguido, a su vez, por el paso 3, que consiste en una translocación y finalmente, de nuevo en el paso 4, se lleva a cabo un proceso de polimerización (Blackburn y Szostak, 1984; Greider y Blackburn, 1987, 1989).

> La RNA-telomerasa es en esencia una ribonucleoproteína transcriptasa reversa.

La partícula de reconocimiento de la señal (SRP-RNA) inicialmente se denomina 7-SL RNA, en función de su coeficiente de sedimentación y para distinguirla de la 7-SK RNA, con la que no guarda relación. La SRP RNA se combina con los ribosomas involucrados en la translocación de proteínas, a través de la membrana del retículo endoplásmico; esta asociación es temporal, puesto que, una vez que el complejo translocacional se ha formado, la

SRP RNA deja al ribosoma. Sin embargo, no puede ser considerada como una tercera subunidad ribosomal. La principal función de la SRP RNA es asegurar una adecuada disposición de las proteínas y probablemente esté involucrada en alguno de los pasos indispensables para la regulación de la traducción (Birnstiel y Schaufele, 1988; Rapaport, 1992).

Otra clase de molécula de RNA la constituye el sno-7-2-RNA, el cual es de localización nucleolar, y está asociado con la proteína Th; posee una longitud de 268 nucleótidos y es un gen de una sola copia, transcrito por la RNA-polimerasa III. El sno-7-2-RNA parece ser idéntico a la Rnasa MRP, la cual está involucrada en la replicación del DNA mitocondrial (Gold y cols., 1989; Kiss y Filipowicks, 1992).

El 7SK RNA, también conocido como 7-3RNA, K RNA, snKRNA, está constituido por 331 nucleótidos y un grupo de proteínas que muestran un coeficiente de sedimentación de 12S; su alta conservación evolutiva y abundancia sugieren que su papel en la función celular sea importante; es transcrito por la RNA-polimerasa II. El gen que codifica para el 7SK RNA, al igual que el gen para el snRNA U6, constituyen una subpoblación en los genes de clase III, en los que su promotor está localizado en nucleótidos, antes del sitio de iniciación de la transcripción, en lugar de ubicarse en la región codificable. Los promotores para estos dos tipos de RNA contienen tres elementos en común: a) Una secuencia proximal similar a la de los snRNA de serie U, transcritos por la RNA-polimerasa II; b) una caja TATA, y c) una región amplificadora distal (Wassarman y Steitz, 1991).

Edición de RNA

El término edición de RNA debe comprenderse como un mecanismo completamente distinto al clásico procesamiento del pre-mRNA, debido a que en el proceso de edición cambia la información genética a nivel del mRNA, ya que se pueden involucrar inserciones o deleciones nucleotídicas, así como la modificación de nucleótidos codificados. Este mecanismo de edición ocurre fundamentalmente en ciertos mRNA, para crear codones de iniciación y terminación. Este proceso ha sido identificado en cinetoplastos, plantas y mamíferos. Para que la edición del RNA ocurra, se requiere de una secuencia molde, denominada RNAg, la cual tiene aproximadamente 10 nucleótidos de longitud y se hibrida con la región 5' terminal del pre-mRNA, en un sitio definido. Este proceso en las mitocondrias de tripanosomas puede incluso transferir información genética de un RNA a otro (Benne y cols., 1986; Decker y Sollner-Webb, 1990; Harris y Hajduk, 1992; Seiwert, 1996).

El mecanismo de edición ocurre fundamentalmente en ciertos mRNA, para crear codones de iniciación y terminación.



Referencias bibliográficas

Abrahams, J.P.; Van den Berg, M.; Van Batenburg, E. y Pleij, C., "Prediction of RNA secondary structure, including pseudoknotting, by computer simulation", *Nucleic Acids Res.,* **18:** 3035-3044, 1990.

Altman, S., "Ribonuclease, P", *J. Biol. Chem.,* **265:** 20053-20056, 1990.

Antao, V.P.; Lai, S.Y. y Tinoco, I. Jr., "A thermodynamic study of unusually stable RNA and DNA hairpins", *Nucleic Acids Res.,* **19:** 5901-5905, 1991.

Bartkiewicz, M.; Gold, H. y Altman, S., "Identification and characterization of an RNA molecule that copurifies with Rnase P activity from HeLa cells", *Genes Dev.,* **3:** 488-499, 1989.

Baserga, S.J.; Yang, X. y Steitz, J.A., "An intact box C sequence in the U3 snRNA is requiered for binding of fibrillarin, the common to the major family of nucleolar snRNPs", *EMBO J.,* **10:** 2645-2651, 1991.

Benne, R.; Van den Burg, J.; Brakenhoff, J.P.; Sloof, P.; Van Bloom, J.H. y Tromp, M.C., "Major transcript of the frameshifted cox II gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA", *Cell,* **46:** 819-826, 1986.

Birnstiel, M.L. y Schaufele, F.J., "Structure and function of minor snRNPs", en *Small nuclear ribonucleoprotein particles,* M.L. Birnstiel (De.), Springer Verlag, Berlín, 155-182, 1988.

Björk, G.R., "The role of modified nucleosides in transfer RNA interactions", en *Transfer RNA in protein synthesis,* D.L. Hatfield *y cols*., eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU., 23-85, 1992.

Blackburn, E.H. y Szostak, J.W., "The molecular structure of centromeres and telomeres", *Ann. Rev. Biochem.,* **53:** 163-194, 1984.

Bond, U.M.; Yario, T.A. y Steitz, J.A., "Multiple processing-defective mutations in a mammalian histone premessenger RNA are suppressed by compensatory changes in U7 RNA both *in vivo* and *in vitro*", *Genes Dev.,* **5:** 1709-1722, 1991.

Bowman, L.H.; Goldman, W.E.; Goldberg, G.I.; Herbert, M.B. y Schlessinger, D., "Location of the initial cleavages sites in mouse pre-rRNA", *Mol. Cell Biol.,* **3:** 1501-1510, 1983.

———— ; Rabin, B. y Schlessinger, D., "Multiple ribosomal RNA cleavage in mammalian cells", *Nucleic Acids Res.,* **9:** 4951-4966, 1981.

Brosius, J.; Dull, T.J. y Noller, H.F., "Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from Escherichia coli", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **77:** 201-204, 1980.

———— ; Palmer, M.L.; Kennedy, P.J. y Noller, H.F., "Complete nucleotide sequence of a 16S ribosmal RNA gene from Escherichia coli", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **75:** 4801-4805, 1978.

Brown, J.W. y Pace, N.R., "Ribonuclease P RNA and protein subunits from bacteria", *Nucleic Acids Res.,* **20:** 1451-1456, 1992.

Brownlee, G.G.; Sanger, F. y Barell, B.G., "The sequence of 5S ribosomal ribonucleic acid", *J. Mol. Biol.,* **34:** 379-412, 1968.

Cech, T.R., "Self-Splicing of Group I introns", *Ann. Rev. Biochem.,* **54:** 543-568, 1990.

———— ; Zaug, A.J. y Grabowski, P.J., "In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence", *Cell,* **27:** 487-496, 1981.

Chambon, P., "Eucaryotic nuclear RNA polymerases", *Ann. Rev. Biochem.,* **44:** 613-638, 1975.

Cheong, C.; Varani, G. y Tinoco, I. Jr., "Solution structure of an unusually stable RNA hairpin", *Nature,* **346:** 680-682, 1990.

Choy, B. y Green, M.R., "Eukaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly", *Nature,* **366:** 531-536, 1993.

Conaway, R.C. y Conaway, J.W., "General initiation factors for RNA polymerase II", *Ann. Rev. Biochem.,* **62:** 161-190, 1993.

Cortés, J.J.; Sontheimer, E.; Seiwert, S.D. y Steitz, J.A., "Mutations in the conserved loop of human U5 snRNA generate use of novel cryptic 5'splice site", *EMBO J.,* **12:** 5181-5189, 1993.

Datta, B. y Weiner, A.M., "Genetic evidence for base pairing between U2 and U6 snRNAs in mammalian mRNA splicing", *Nature,* **352:** 821-824, 1991.

Decker, C.J. y Sollner, Webb B., "RNA editing involves indiscriminate U changes throughout precisely defined editing domains", *Cell,* **61:** 1001-1011, 1990.

Dynlacht, B.D., Hoey, T. y Tijan R., "Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation", *Cell,* **66:** 563-576, 1991.

Gabrielsen, O.S. y Sentenac, A., "RNA polymerase III and its transcription factors", *Trends Biochem. Sci.,* **16:** 412-416, 1991.

Gallie, D.R., "The cap and poly (A) tail function synergistically to regulate mRNA translation efficiency", *Genes & Development,* **5:** 2108-2116, 1991.

Geiduschek, E.P. y Kassvetis, G.A., "RNA polymerase III transcription complex", en *Transcription regulation,* S.L. McKnight y K.R. Yamamoto, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 247-279, 1992

——— y Tocchini-Valentini, G.P., "Transcription by RNA polymerase III", *Ann. Rev. Biochem.,* **57:** 873-914, 1988.

Gold, H.A.; Topper, J.N.; Clayton, D.A. y Craft, J., "The RNA processing enzyme Rnase MRP is identical to the Th RNP and related to Rnase P"., *Science,* **245:** 1377-1380, 1989.

Greider, C.W. y Blackburn, E.H., "A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis", *Nature,* **337:** 331-337, 1989.

———, "The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two distinct primer specificity components", *Cell,* **51:** 887-898, 1987.

Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N. y Altman, S., "The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme", *Cell,* **35:** 849-857, 1983.

Hannon, G.J.; Maroney, P.A.; Branch, A.; Benenfield, B.J.; Robertson, H.D. y Nilsen, T.W., "Accurate processing of human pre-rRNA in vitro", *Mol. Cell Biol.,* **9:** 4422-4431, 1989.

Harris, M.E. y Hajduk, S.L., "Kinetoplastid RNA editing: In vitro formation of cytochrome b gRNA-mRNA chimeras from synthetic substrate RNAs", *Cell,* **68:** 1091-1099, 1992.

Holley, R.W.; Apgar, J.; Everett, G.A. *y cols.*, "Structure of a ribonucleic acid", *Science,* **147:** 1462-1465, 1965.

Jacquier, A., "Self-splicing group II and nuclear pre-mRNA introns: How similar are they?", *Trends Biochem. Sci.,* **15:** 351-354, 1990.

Kiss, T. y Filipowicks, W., "Evidence against a mitochondrial location of the 7-2/MRP RNA in mammalian cells", *Cell,* **70:** 11-16, 1992.

Lerner, M.R.; Boyle, J.A.; Mount, S.M.; Wolin, S.L. y Steitz, J.A., "Are snRNPs involved in splicing?", *Nature,* **283:** 220-224, 1980.

Li, H.V.; Zagorski, J. y Fournier, M.J., "Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18S rRNA in Saccharomyces cerevisiae", *Mol. Cell Biol.,* **10:** 1145-1152, 1990.

Losick, R. y Chamberlin, M., *RNA polymerase,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1976.

Madhani, H.D. y Guthrie, C. "A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggest a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome", *Cell,* **71:** 803-817, 1992.

Michel, F.; Umesosno, K. y Ozeki, H., "Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns- a review", *Gene,* **82:** 5-30, 1989.

Moras, D., "Structural and functional relationships between aminoacyl-tRNA synthetases", *Trends Biochem. Sci.,* **17:** 159-164, 1992.

Moss, T. y Stefanovsky, V.Y., "Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I", *Nucleic Acids Res. Mol. Biol.,* **50:** 25-66, 1995.

Muto, A.; Andachi, Y.; Yuzawa, H. *y cols.,* "The organization and evolution of transfer RNA genes in *Mycoplasma capriocolum*", *Nucleic Acids Res.,* **18:** 5037-5043, 1990.

Nevins, J.R., "The pathway of eukariotic mRNA formation", *Ann. Rev. Biochem.,* **52:** 441-466, 1983.

Newman, A. y Norman, C., "Mutations in yeast U5 snRNA alter the specificity of 5'splice site cleavage", *Cell,* **65:** 115-123, 1991.

Noller, H.F., "Ribosomal RNA and translation", *Ann. Rev. Biochem.,* **60:** 191-227, 1991.

Noller, H.F., "Structure of Ribosomal RNA", *Ann. Rev. Biochem.,* **53:** 119-162, 1984.

O'Brien, C.H. y Wolin, S.L., "A possible role for the 60 kD Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors", *Genes & Development,* **8:** 2891-2903, 1994.

Ossipow, V.; Tassan, J.P.; Nigg, E.A. y Schibler, U., "A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation", *Cell,* **83:** 137-146, 1995.

Paule, M.R., "Transcription of ribosomal RNA by eukaryotic RNA polimerase I", en *Transcription: Mechanism and regulation,* Conaway, R.C. y Conaway J.W., eds., Raven Press, Nueva York, 83-106, 1994.

Peculis, B.A. y Steitz, J.A., "Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the Xenopus oocyte", *Cell,* **73:** 1233-1245, 1993.

Platt, T., "Transcription termination and the regulation of gene expression", *Ann. Rev. Biochem.,* **55:** 339-372, 1986.

Rapaport, T.A., "Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane", *Science,* **258:** 931-936, 1992.

Reed, R. y Maniatis, T., "Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing", *Cell,* **41:** 95-105, 1985.

Reich, C.I.; Hoy, R.W.V.; Porter, G.L. y Wise, J.A., "Mutations at the 3'splice site can be suppressed by compensatory base changes in U1 snRNA in fission yeast", *Cell,* **69:** 1159-1169, 1992.

Reinberg, D. y Roeder, R.G., "Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II", *J. Biol. Chem.,* **262:** 3310-3321, 1987.

Ruffner, D.; Stornia, G.D. y Uhlenbeck O., "Sequence requirements of the Hammerhead RNA self-cleavage reaction", *Biochemistry,* **29:** 10695-10702, 1990.

Sachs, A.B., "Messenger RNA degradation in eukaryotes", *Cell,* **15:** 85-90, 1993.

Savino, R. y Gerbi, S.A., "In vivo disruption of Xenopus U3 snRNA affects ribosomal RNA processing", *EMBO J.,* **9:** 2299-2308, 1990.

Scharl, E.C. y Steitz, J.A., "The site of 3'end formation of histone messenger RNA is a fixed distance from the downstream element recognized by the U7 snRNP", *EMBO J.,* **13:** 2432-2440, 1994.

Seiwert, S.D., "RNA editing hints of a remarkable diversity in gene expression pathways", *Science,* **274:** 1636-1637, 1996.

Sharp, P.A., "On the origin of RNA splicing and introns", *Cell;* **42:** 397-400, 1985.

———— , "Split genes and RNA splicing", *Nobel Lecture*, *Cell,* **77:** 805-815, 1994.

Shumard, C.M. y Eichler, D.C., "Ribosomal RNA processing", *J. Biol. Chem.,* **263:** 19346-19352, 1988.

Siebenlist, U.; Simpson, R.B. y Gilbert, W. E., "Coli RNA polymerase interacts homologously with two different promoters", *Cell,* **20:** 269-281, 1980.

Söll, D.; Jones, D.S.; Ohtsuka, E.; Faulkner, R.D. *y cols.,* "Specificity of sRNA for recognition of codons as studied by the ribosomal binding technique", *J. Mol. Biol.,* **19:** 556-575, 1966.

Sollner-Webb, B. y Tower, J., "Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes", *Ann. Rev. Biochem.,* **55:** 801-830, 1986.

———— ; Tyc, K. y Steitz, J.A., "Ribosomal RNA processing in eukaryotes", en *Ribosomal RNA: Structure, evolution, processing and function in protein synthesis,* Dahlberg, A.E. y Zimmermann, R.A. eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993.

Steinberg, S.A.; Misch, A. y Sprinzl, M., "Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes", *Nucleic Acids Res.,* **21:** 1993.

Takgaki, V.; Ryner, L.C. y Manley, J.L., "Separation and characterization of a poly (A) polymerase and characterization of a poly (A) polymerase and a cleavage/specific factor required for pre-mRNA polyadenylation", *Cell,* **52:** 731-742, 1988.

Tarn, W.Y. y Steitz, J.A., "A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excices a minor class (AT-AC) intron In Vitro", *Cell,* **84:** 801-8011, 1996.

Tyc, K. y Steitz, J.A., "U3, U8, U13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus", *EMBO J.,* **8:3** 113-3119, 1989.

Tycoswski, K.T.; Shu, M.D. y Steitz, J.A., "A small nucleolar RNA is processed from an intron of the human gene encoding ribosomal protein S3", *Genes & Development,* **7:** 1176-1190, 1993.

Usheva, A., y Shenk, T., "TATA-binding protein-independent initiation: YYI, TIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA", *Cell,* **76:** 1115-1121, 1994.

Wassarman, D.A., y Steitz, J.A., "Structural analyses of the 7SK ribonucleoprotein: The most abundant human small RNP of unknown function", *Mol. Cell Biol.,* **11:3** 432-3445, 1991.

————, K.M. y Steitz, J.A., "The low abundance U11 and U12 snRNPs interact to form a two-snRNP complex", *Mol. Cell Biol.,* **12:** 1276-1285, 1992.

Whale, E., y Keller, W., "The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors", *Ann. Rev. Biochem.,* **61:** 419-440, 1992.

Wickens, M., "How the messenger got its tail: addition of poly (A) in the nucleus", *Trends Biochem. Sci.,* **15:** 277-281, 1990.

————, "In the beginning is the end: regulation of poly (A) addition and removal during early development", *Trends Biochem. Sci.,* **15:** 320-324, 1990.

Wolin, S.L. y Steitz, J.A., "The Ro cytoplasmic ribonucleoprotein: Identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs", *Proc. Natl. Acad. Sci,* **81:** 1996-2000, 1984.

Yokoyama, S. y Nishimura, S., "Structures of modified nucleosides found in tRNA", en *Transfer RNA,* Söll, D. y RajBhandary, U.L. eds., American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1993.

Young, R.A., "RNA polymerase II", *Ann. Rev. Biochem.,* **60:** 689-715, 1991.

Zawel, L. y Reinberg, D., "Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes", *Ann. Rev. Biochem.,* **64:** 533-561, 1995.

Zhuang, Y. y Weiner, A.M., "A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5'splice site mutation", *Cell,* **46:** 827-835, 1986.

CAPÍTULO 3

LAS PROTEÍNAS

Francisco Xavier Soberón Mainero



Introducción

En el presente capítulo se abordarán algunos de los aspectos más relevantes respecto a la relación secuencia-estructura-función de las proteínas. El tratamiento pretende centrarse en varios aspectos que se encuentran en la frontera del conocimiento actual. Por lo tanto, ciertos tópicos bien establecidos sólo se describirán en forma somera, tomando en cuenta que se encuentran invariablemente presentes en los textos básicos de bioquímica y biología molecular.



Las proteínas como polímeros con funciones específicas

La evolución ha utilizado la virtualmente ilimitada capacidad de crear diversidad molecular, posible en los polímeros de secuencia específica, para satisfacer una gigantesca variedad de requerimientos funcionales. A partir de la utilización de un repertorio de 20 aminoácidos, los seres vivos construyen macromoléculas de gran particularidad (en contraste con otras estructuras poliméricas cuyas propiedades son periódicas): poseen una estructura tridimensional específica, despliegan actividades frecuentemente evidentes y manifiestan propiedades fisicoquímicas definidas que han facilitado su identificación y purificación. Tal vez sea por estas razones que el papel central de las proteínas en los sistemas biológicos ha sido reconocido desde el siglo pasado, antes que el de otras macromoléculas biológicas.

La diversidad de funciones que desempeñan las proteínas en los seres vivos es en verdad amplia. Prácticamente, toda transacción biológica muestra, a nivel molecular, la intervención de una o más proteínas. Algunas cadenas polipeptídicas forman glóbulos compactos, solubles en agua (proteínas globulares), otras se estructuran en fibras con propiedades de alta resistencia o elasticidad (proteínas fibrosas), otras más pueden embeberse en los ambientes hidrófobos de las membranas (proteínas membranales). En

términos generales, podemos dividir también a las proteínas en grandes grupos funcionales, entre los que destacan aquellas que catalizan reacciones químicas (enzimas) y aquellas que median señalización molecular, sin afectar la estructura covalente de las moléculas con las que interactúan (factores). Se estima que en la especie humana existen no menos de 35,000 genes, la mayoría de los cuales codifican para proteínas, por lo que habría decenas de miles de proteínas diferentes involucradas en las funciones biológicas de un mamífero (tomando en cuenta que un solo gen puede codificar para más de una proteína mediante el proceso conocido como edición diferencial del RNA). Para cada uno de los tipos de proteínas referidas se mencionarán algunos ejemplos que ilustran la impresionante versatilidad y eficiencia que caracteriza a estos polímeros biológicos.

Se estima que en la especie humana existen no menos de 35,000 genes, la mayoría de los cuales codifican para proteínas, por lo que habría decenas de miles de proteínas diferentes involucradas en las funciones biológicas de un mamífero.

Existen muchas enzimas que aceleran reacciones químicas específicas a un nivel máximo, sólo limitado por la velocidad de difusión del sustrato a la región catalítica de la proteína. Desde las reacciones iniciales de degradación de compuestos alimentarios en el sistema digestivo, hasta la construcción, paso a paso, de las moléculas más complejas, las enzimas ejecutan las instrucciones plasmadas en el genoma para orquestar el flujo de materia y energía que subyace en el funcionamiento de todo ser vivo.

Utilizando desde estructuras de aparente simplicidad, como la triosa fosfato-isomerasa (figura 3-1a), hasta estructuras de gran tamaño y complejidad, en donde se reclutan también metales y otras moléculas orgánicas, como en la nitrogenasa (figura 3-1b), en la naturaleza han surgido máquinas catalíticas que han permitido afrontar el continuo reto adaptativo.

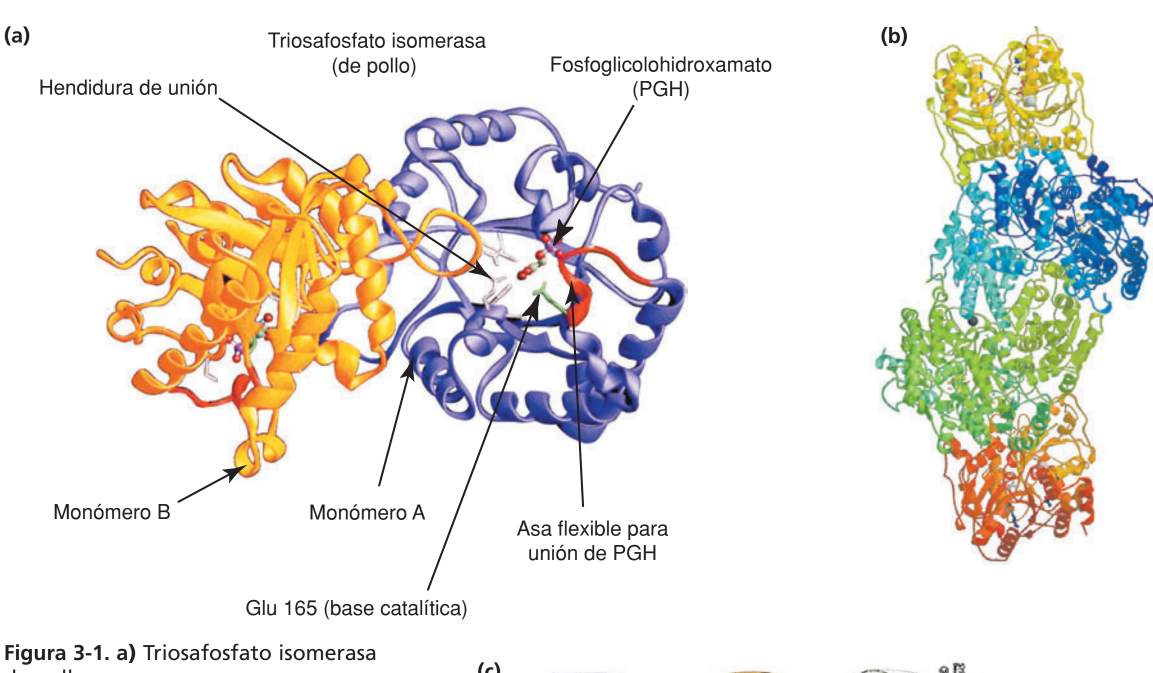




Figura 3-1. a) Triosafosfato isomerasa de pollo.
b) Nitrogenasa.
c) Colágena.
Véase el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

Otro tema recurrente en el uso de proteínas es su uso para emitir y recibir señales de todo tipo. En un nivel fundamental, moléculas de proteínas se asocian al material genético y convierten condiciones ambientales en señales para activar o desactivar genes específicos, como en el caso del famoso represor de la vía metabólica para degradación de lactosa. Un gran número de hormonas, tales como la insulina, tienen naturaleza proteica, así como la gran mayoría de los receptores que detectan las señales y las "transducen" hacia el interior de las células. Estos últimos están normalmente constituidos por proteínas con componentes transmembranales.

Moléculas de proteínas se asocian al material genético y convierten condiciones ambientales en señales para activar o desactivar genes específicos.

La función de las proteínas también puede resultar de propiedades periódicas, de manera análoga a lo que ocurre con polímeros artificiales. Tal es el caso de las proteínas fibrosas, que normalmente se conforman a partir de repeticiones de secuencias sencillas y cortas. La queratina, constitutiva de pelo y uñas, y la colágena, presente en tendones y tejido conectivo (figura 3-1c), son ejemplos de proteínas fibrosas. En el caso de algunas proteínas de los músculos, responsables de sus propiedades contráctiles, se observa una combinación de elementos catalíticos con componentes de tipo fibrilar y se acopla la hidrólisis de ATP con la generación de energía mecánica.

La queratina, constitutiva de pelo y uñas, y la colágena, presente en tendones y tejido conectivo son ejemplos de proteínas fibrosas.

Tal vez uno de los ejemplos más elocuentes de la versatilidad de funciones que se pueden presentar en las proteínas sea la enzima sintasa de ATP, que participa en un proceso metabólico verdaderamente central. Desde que se describió que el flujo de electrones desde las moléculas de NAD hasta el oxígeno resultaba en la síntesis neta de ATP, surgió una pregunta apremiante: ¿cómo ocurre el acoplamiento entre uno y otro fenómenos? La teoría quimioosmótica definió que la cadena respiratoria genera una distribución asimétrica de iones en uno y otro lado de la membrana, y que el paso de protones a través de la sintasa de ATP resultaba en la generación de esta molécula de alta energía. Pero es sólo muy recientemente cuando se definió el mecanismo de acción de la sintasa de ATP. Esta enzima es transmembranal; la podríamos considerar como un canal iónico, selectivo para protones y, además, resulta en la generación de ATP a través de un proceso que involucra la formación de energía mecánica: es mediante el giro de varios componentes de la enzima que se da el proceso de unión de los sustratos y liberación de los productos. Por estas razones, a la sintasa de ATP se le ha llamado "nanomotor electroquímico-mecánico-químico".

La diversidad de funciones de las proteínas proviene, en última instancia, de la interacción concertada de los aminoácidos asociados en un orden especificado por los genes. La proposición de C. Anfinsen, en el sentido de que la secuencia de aminoácidos de una proteína determina su estructura y su función, constituye un punto de partida, aún perfectamente vigente, para conceptualizar a estas macromoléculas. Para ayudar a desentrañar el papel que desempeñan los monómeros constituyentes de las proteínas —los aminoácidos— se puede partir de una clasificación de éstos de acuerdo a diversos atributos. Resulta imposible, sin embargo, arrojar luz sobre los diversos papeles que pueden desempeñar los aminoácidos en la estructuración o la funcionalidad de las proteínas, si se atiende a criterios únicos de

La diversidad de funciones de las proteínas proviene, en última instancia, de la interacción concertada de los aminoácidos asociados en un orden especificado por los genes.

Los monómeros constituyentes de las proteínas son los aminoácidos.

clasificación. En el cuadro 3-1 se muestra, en forma matricial, una lista de los aminoácidos en la que se destacan sus propiedades en cuanto son relevantes para diversos atributos de las proteínas. La identidad de un aminoácido particular puede cumplir una función esencialmente estructural, una función catalítica o una función de reconocimiento molecular, o inclusive, puede ser poco relevante en el contexto de una proteína dada. Una observación importante es que, en las cadenas laterales del repertorio de 20 aminoácidos, existe una relativa diversidad en cuanto a su hidrofobicidad, su tamaño y sus propiedades fisicoquímicas. En las secciones sucesivas, se intentará destacar el papel que desempeñan estos atributos en diferentes contextos.

Cuadro 3-1

Aminoácido (Código de una letra)	Hidrofobicidad	Tamaño	Propiedades particulares
Glicina (G)	No polar	Muy pequeño	Máxima flexibilidad
Alanina (A)	No polar	Pequeño	Abundante en proteínas
Valina (V)	Hidrofóbico	Mediano	Esencial en dieta humana. Ramificado
Leucina (L)	Muy hidrofóbico	Grande	Esencial. Abundante
Isoleucina (I)	Muy hidrofóbico	Grande	Esencial. Ramificado. Doble centro quiral
Metionina (M)	Muy hidrofóbico	Grande	Esencial. Escaso. Oxidable
Prolina (P)	Hidrofóbico	Mediano	Cíclico. Rígido
Fenilalanina (F)	Hidrofóbico (aromático)	Grande	Esencial. Interacciones Van der Waals especiales. Absorbe UV cercano
Triptofano (W)	Hidrofóbico (aromático)	Grande	Esencial. Absorbe UV cercano. Fluorescente. Escaso
Serina (S)	Polar	Pequeño	Nucleofílico
Treonina (T)	Polar	Mediano	Esencial. Doble centro quiral
Asparagina (N)	Polar	Grande	Inestable a alta temperatura
Glutamina (Q)	Polar	Grande	
Tirosina (Y)	Polar	Grande	Grupo fenólico reactivo (pK_R 10.46)
Cisteína (C)	Polar	Pequeño	Nucleofílico. Puede formar puentes disulfuro. Escaso (pK_R 8.37)
Lisina (K)	Cargado (+)	Grande	Esencial. Puede formar base de Schiff (pK_R 10.54)
Arginina (R)	Cargado (+)	Grande	Esencial (pK_R 12.48)
Histidina (H)	Puede estar cargado (+)	Grande	Esencial. Escaso. Interacción versátil por su pK_R casi neutro (6.04)
Ácido aspártico (D)	Cargado (–)	Grande	Frecuentemente en el sitio activo por su reactividad (pk_R 3.9)
Ácido glutámico (E)	Cargado (–)	Grande	Similar a aspártico (pK_R 4.07)



Secuencia de proteínas y filogenia

Dado que la identidad de una proteína está determinada por su secuencia de aminoácidos, la determinación de ésta ha resultado un objetivo de evidente importancia. Los métodos experimentales que permiten lograrlo han estado en continua transformación y refinamiento desde los trabajos pioneros de Frederic Sanger, en la década de 1950. El elegante método de degradación secuencial, a partir del extremo aminoterminal, mediante la acción del reactivo de Edman (figura 3-2), continúa siendo utilizado abundantemente y ha permitido la derivación de secuencia en un sinnúmero de proteínas. En la actualidad, sin embargo, el grueso de la información sobre secuencia de proteínas proviene de su inferencia a partir de la secuencia nucleotídica de los genes que las codifican. La naturaleza fisicoquímica de los polímeros informacionales, es decir, los ácidos nucleicos, en particular la simplicidad proveniente de su composición con sólo cuatro monómeros diferentes, su capacidad de asociación por complementariedad de bases y sus propiedades

> La identidad de una proteína está determinada por su secuencia de aminoácidos.

> En la actualidad, el grueso de la información sobre la secuencia de proteínas proviene de su inferencia a partir de la secuencia nucleotídica de los genes que las codifican.

Fenil isotiocianato (PITC)

Polipéptido

OH^-

Polipéptido PTC

F_3CCOOH anhídrido

Derivado de tiazolinona

Péptido original menos su residuo N–terminal

H^+

Aminoácido PTH

Figura 3-2. Degradación de Edman.

replicativas, resultan en una mayor simplicidad y economía en la determinación de la secuencia. Lo anterior no implica que los métodos de secuenciación directa de aminoácidos vayan a caer en desuso. Solamente se refiere a la mayor parte de la información como tal. La necesidad de obtener datos de secuencia directamente a partir de muestras de proteína continuará siendo de vital importancia por varias razones. En primer lugar, no siempre es posible predecir con certeza que una determinada secuencia de DNA se expresa realmente para producir una proteína; los datos experimentales que confirman la identidad de una proteína y su procedencia de un gen particular, resultan indispensables para avanzar firmemente. Por fortuna, un segmento pequeño de secuencia directa puede bastar para este propósito. Por otra parte, las modificaciones que sufren las proteínas después de emerger del proceso de traducción requieren una definición precisa de dónde inicia, dónde termina y, en algunos casos, dónde se interrumpe y reinicia (por acción de proteasas específicas) la parte madura, funcional, presente realmente en la célula. En este sentido, algunos de los métodos más modernos para determinar secuencia de proteínas proveen una gran simplicidad y eficiencia. En particular, la espectroscopia de masas ha recibido un importante impulso en los tiempos recientes. Esta técnica permite la identificación del peso molecular de compuestos con una extraordinaria precisión y, a partir de que se resolvió el problema de volatilizar las muestras de macromoléculas, mediante las técnicas denominadas *electrospray* y *matrix assisted, laser desorption ionization* (MALDI), se ha multiplicado su uso en el análisis de biomoléculas. La secuencia de aminoácidos puede ser derivada mediante la identificación de los pesos moleculares de productos sucesivos de degradación de proteínas (figura 3-3), cada uno con un aminoácido menos,

No siempre es posible predecir con certeza que una determinada secuencia de DNA se expresa realmente para producir una proteína.

Los métodos más modernos para determinar secuencia de proteínas proveen una gran simplicidad y eficiencia. En particular, la espectroscopia de masas.

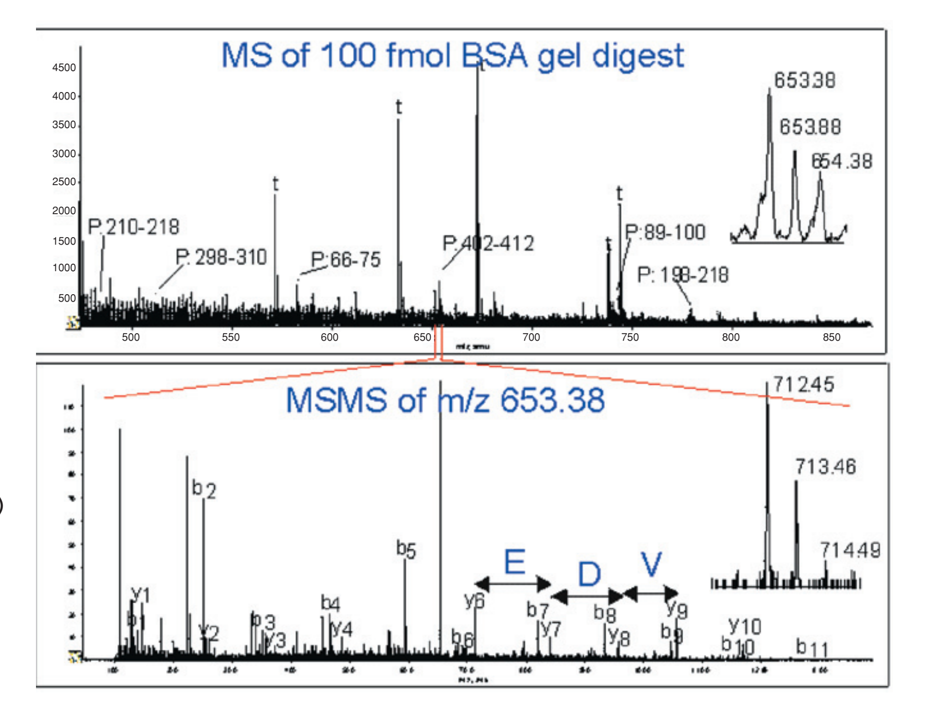


Figura 3-3. Resultado de un experimento de espectrometría de masas en tándem, donde se revela un segmento de secuencia, mediante el análisis sucesivo (tándem) de especies peptídicas separadas por su peso molecular.
Véase el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

a partir de la diferencia exacta de peso molecular entre uno y otro (los pesos moleculares de cada uno de los aminoácidos los identifican inequívocamente, con la excepción de leucina e isoleucina). Estas técnicas permiten, asimismo, identificar modificaciones adicionales, como por ejemplo fosforilaciones. Combinando una mejoría en la sensibilidad de la espectroscopia de masas con los métodos actuales de separación (cuadro 3-1) se pueden identificar pequeños trechos de secuencia en cualquiera de los miles de proteínas presentes en una célula en una determinada condición. Esta información, a su vez, puede ser usada para localizar el gen que codifica a la proteína, sea de manera experimental o mediante la exploración de las bases de datos donde puede existir de antemano la secuencia nucleotídica.

A pesar de que tengamos la persuasión de que la secuencia de aminoácidos (también conocida como estructura primaria) determina la estructura tridimensional y la función de una proteína, el conocimiento actual no nos permite hacer la deducción correspondiente. En el estudio de las proteínas debemos recurrir a determinar experimentalmente también su estructura tridimensional (ver más adelante) y sus propiedades bioquímicas. En forma inmediata, sin embargo, la vastísima base de conocimientos preexistentes sobre un gran número de proteínas nos permite hacer inferencias, estructurales y funcionales, con base en el parecido que existe entre sus secuencias. En efecto, el registro cuantitativo que implica una secuencia de aminoácidos constituye una indicación de su linaje evolutivo y nos puede proveer, de inmediato, con la capacidad de hacer inferencias estructurales y funcionales. Para lograr este objetivo se necesita disponer de métodos eficaces y sensibles para comparar unas secuencias con otras.

Para describir la utilización de información de secuencia consideraremos un conjunto de proteínas, las pertenecientes a la superfamilia de los reguladores bacterianos conocidos como unidores de estimuladores (*enhancer*), en cuyo estudio hemos colaborado: quizá no constituyan el ejemplo más clásico, pero tendremos la ventaja de referirnos a un sistema que conocemos con mayor profundidad, y además presentan características ilustrativas de las variables relevantes en la comparación de secuencias. Iniciemos el estudio basándonos en la proteína NifA, que es un regulador de la expresión genética involucrado en la fijación de nitrógeno. Se conocen varias secuencias de NifA (todas ellas deducidas de las secuencias nucleotídicas respectivas), provenientes de otras tantas especies bacterianas fijadoras de nitrógeno (figura 3-4). Como se puede observar, un alineamiento de las secuencias consiste en establecer una correspondencia de los residuos de aminoácidos a lo largo de la proteína. En un gran número de casos, los residuos son iguales y, donde existen diferencias, es evidente que éstas surgieron por la acumulación de mutaciones. Es decir, con secuencias tan parecidas y la conservación de la función, tenemos la seguridad de que estas proteínas provienen de una sola, identificable con la proteína presente en el ancestro común a los linajes bacterianos en estudio. Denotamos este concepto diciendo que las proteínas son homólogas. Vale la pena notar también que, para lograr una máxima correspondencia de aminoácidos iguales, hay necesidad de introducir inserciones y deleciones (*indels*), que corresponden a episodios de mutación en los que las bases del DNA no se sustituyeron, si-

Una secuencia de aminoácidos constituye una indicación de su linaje evolutivo.

NifA, es un regulador de la expresión genética involucrado en la fijación de nitrógeno.

Un alineamiento de las secuencias consiste en establecer una correspondencia de los residuos de aminoácidos a lo largo de la proteína.

Con secuencias tan parecidas y la conservación de la función, tenemos la seguridad de que estas proteínas provienen de una sola, identificable con la proteína presente en el ancestro común a los linajes bacterianos en estudio. Denotamos este concepto diciendo que las proteínas son homólogas.

(a)

NIFA_RHIME NCPALSESLLESELFGHEKGAFTGAIAQRVGRFESANGGTLLLDEIGEIPPAFQAKLLRVIQEGEFERV
NIFA_BRAJA NCAALPETVLESELFGHEKGAFTGAVSARKGRFELADKGTLFLDEIGEISPPFQAKLLRVLQEQEFERV
NIFA_AZOBR NCAALPESLLESELFGHEKGAFTGAQKDHKGRFELASGGTLFLDEIGDISPNFQAKLLRVLQEQEFERV
NIFA_KLEPN NCAALPDNLLESELFGHEKGAFTGAVRQRKGRFELADGGTLFLDEIGESSASFQAKLLRILQEGEMERV

(b)

NTRC_RHIME NMAAIPRDLIESELFGHEKGAFTGAQTRSTGRFEQAEGGTLFLDEIGDMPMDAQTRLLRVLQQGEYTTV
NTRC_BRAJA NMAAIPRDLIESELFGHERGAFTGANTRASGRFEQAEGGTLFLDEIGDMPMEAQTRLLRVLQQGEYTTV
NTRC_AZOBR NMAAIPRELIESELFGHEKGAFTGATNRSTGRFEQAQGGTLFLDEIGDMPLEAQTRLLRVLQEGEYTTV
NTRC_KLEPN NMAAIPKDLIESELFGHEKGAFTGANTVRQGRFEQADGGTLFLDEIGDMPLDVQTRLLRVLADGQFYRV

NIFA_RHIME NCPALSESLLESELFGHEKGAFTGAIAQRVGRFESANGGTLLLDEIGEIPPAFQAKLLRVLQEGEFERV
NIFA_BRAJA NCAALPETVLESELFGHEKGAFTGAVSARKGRFELADKGTLFLDEIGEISPPFQAKLLRVLQEQEFERV
NIFA_AZOBR NCAALPESLLESELFGHEKGAFTGAQKDHKGRFELASGGTLFLDEIGDISPNFQAKLLRVLQEQEFERV
NIFA_KLEPN NCAALPDNLLESELFGHEKGAFTGAVRQRKGRFELADGGTLFLDEIGESSASFQAKLLRILQEGEMERV
NTRC_RHIME NMAAIPRDLIESELFGHEKGAFTGAQTRSTGRFEQAEGGTLFLDEIGDMPMDAQTRLLRVLQQGEYTTV
NTRC_BRAJA NMAAIPRDLIESELFGHERGAFTGANTRASGRFEQAEGGTLFLDEIGDMPMEAQTRLLRVLQQGEYTTV
NTRC_AZOBR NMAAIPRELIESELFGHEKGAFTGATNRSTGRFEQAQGGTLFLDEIGDMPLEAQTRLLRVLQEGEYTTV
NTRC_KLEPN NMAAIPKDLIESELFGHEKGAFTGANTVRQGRFEQADGGTLFLDEIGDMPLDVQTRLLRVLADGQFYRV

(c)

NifA NH_2 COOH

Dominio central

NtrC NH_2 COOH

Figura 3-4.
a) Alineamiento de las proteínas NifA.
b) Alineamiento de las proteínas NtrC y de las proteínas NifA con NtrC.
c) Organización de los dominios estructurales de NifA y NtrC. Solamente el dominio central es homólogo. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

no que se insertaron o eliminaron (cabe hacer notar que, en la actualidad, los métodos para alinear secuencias con el nivel de parecido de NifA están perfectamente estandarizados y disponibles en cualquier juego de programas para análisis de biología molecular). Si extendemos el análisis a proteínas cuya función no es exactamente la misma, seguimos encontrando algunas que se parecen, sin lugar a dudas. Éste es el caso del regulador NtrC (involucrado en el control de metabolismo nitrogenado), por ejemplo, (figura 3-4b). Las diferentes versiones de NtrC son entre sí bastante parecidas, pero además es indudable que NtrC y NifA tienen también algo en común. Se puede demostrar estadísticamente que un grado de identidad superior a 25%, en trechos de unos 100 aminoácidos o más, sería encontrado con una frecuencia despreciable debido al azar (ver más adelante). Así, inferimos que NtrC y NifA también son proteínas homólogas. Existe una diferencia importante entre ellas; sin embargo, NtrC y NifA cumplen funciones análogas, pero diferentes entre sí. Es un caso similar al ejemplo clásico de la hemoglobina y la mioglobina. Se denota entonces a las diferentes versiones de NifA como ortólogas entre sí y, a su relación con NtrC, como paráloga. Interpretamos que NtrC y NifA provienen de una duplicación genética anterior a la divergencia de las bacterias que las contienen. Existen otras familias de proteínas parálogas a NifA y NtrC, que completan una superfamilia de proteínas homólogas (figura 3-4c). Otra observación interesante es que la similitud entre las proteínas de esta superfamilia no es uniforme en toda su longitud. El análisis cuidadoso indica que solamente un conjunto central de aminoácidos es común a todas las proteínas descritas en la figura. En otras palabras,

el linaje referido se localiza en lo que se llama dominio central de la proteína. Esta característica de muchas proteínas, la de ser mosaicos constituidos por segmentos de origen diferente, puede ser entendida desde una perspectiva estructural (ver más adelante), pero es frecuente que se pueda detectar simplemente con el análisis de secuencias.

Con el avance incesante en la acumulación de datos de secuencia, notablemente los que provienen del esfuerzo de secuenciación de genomas completos, disponemos en la actualidad de la secuencia de millones de proteínas. Evidentemente, el análisis comparativo de estas secuencias requiere de algoritmos eficientes y sistemas computacionales poderosos, y es notable que el progreso de la informática ha sido suficientemente rápido para no sufrir ningún rezago respecto a la acumulación de datos. Más aún, el desarrollo de la red informática Internet permite en la actualidad el acceso a recursos computacionales distribuidos en todo el mundo, lo cual se traduce en una eficiencia y sencillez sin precedentes en la organización y disponibilidad de datos y herramientas de análisis. En el cuadro 3-2 se listan algunas de las bases de datos electrónicas donde se acopian secuencias y estructuras de proteínas disponibles en la actualidad (que probablemente no sea vigente por mucho tiempo), así como el tipo de procesamiento y análisis previo de los datos. Sin duda, el campo de la bioinformática es un área efervescente y de gran importancia en el análisis de proteínas.

> La acumulación de datos de secuencia, notablemente los que provienen del esfuerzo de secuenciación de genomas completos, disponemos en la actualidad de la secuencia de millones de proteínas.

> La bioinformática es un área efervescente y de gran importancia en el análisis de proteínas.



La estructura tridimensional

Como ya establecimos al principio del capítulo, la función de las proteínas, su eficiencia y especificidad de interacción dependen de la conformación que adoptan, es decir, de las contorsiones espontáneas de la cadena lineal de aminoácidos, en lo que se conoce como estructura terciaria o conformación nativa. Una molécula típica de proteína consta de varios cientos de aminoácidos, por lo que constituye un complejísimo sistema con varios miles de átomos. La determinación experimental de la posición relativa de estos átomos en el espacio requirió el desarrollo y adaptación de las técnicas de cristalografía de rayos X. La solución de la primera estructura de proteína tomó a Max Perutz más de 20 años. Hoy en día, la solución de una estructura nueva puede ocurrir en unos cuantos meses (o incluso días, en el contexto de los proyectos de alta eficiencia en la llamada "genómica estructural"), pero sigue constituyendo un logro extraordinario, por la belleza de las técnicas y por la cantidad de información que rinde. En los últimos años se ha logrado, asimismo, incorporar la técnica de resonancia magnética nuclear (NMR) al arsenal de herramientas para la determinación de estructuras proteicas. Producto de los esfuerzos de cristalógrafos y espectroscopistas, disponemos de varios miles de estructuras tridimensionales independientes, con las que podemos realizar estudios comparativos y derivar nociones generales sobre la arquitectura de estas biomoléculas, así como acercarnos desde otra perspectiva al estudio de la evolución molecular.

> *La función* de las proteínas, depende de la conformación que adoptan.

Cuadro 3-2

Operación	**Detalles**
Búsqueda en bases de datos de secuencia	FASTA searches BLITZ Smith-Waterman Searches PROSITE searches BLAST searches Entrez (word searches) Brookhaven National Laboratory Genome Sequences Facility Sequences alignment and modellin system IBCP (France) FASTA search
Asignación de dominios	Prodom Pfam
Alineamiento múltiple de secuencias	IBCP (France) Multalin Server IBCP (France) Clustalw Server IBCP (France) Combined Multalin/Clustalw MSA (USA) Server BCM Multiple Sequence Alignment ClustalW Server (USA)
Modelamiento comparativo o por "homología"	SWISSMODEL WHAT IF (G. Vriend, EMBL, Heidelberg) MODELLER (A. Sali, Rockefeller University) MODELLER Mirror FTP site The NIH Molecular Modeling Home Page
Predicción de estructura secundaria	Métodos que utilizan alineamiento múltiples DSC King & Sternberg (this server) PREDATORFrischman & Argos (EMBL) PHD home page Rost & Sander, EMBL, Germany SSPREDMehta,Heringa & Argos, EMBL, Germany ZPRED Server Zvelebil et. al., Ludwing, U.K. Métodos que utilizan secuencias individuales: SOPM Gcourjon & Deleage, IBCP, France) nnPredict Cohen et al., UCSF, USA. BMERC PSA Server Boston University, USA SSP (Nearest,-neighbor) Solovyev and Salamov, Bylor College, USA.
Reconocimiento de plegamiento	TOPITS Rost, EMBL UCLA-DOE Structre Prediction Server Fishcer & Eisengberg, UCLA 123D Zimmer & Alexandrov
Análisis de familias de plegamiento y alineamiento de estructuras secundarias	SCOP: Structural Classification of Proteins CATH: Protein Structure Classification DALI server for protein 3D structure searching NIH PDB at a glance classification

Empecemos por describir, someramente, las características sobresalientes de las dos técnicas experimentales utilizadas para acercarse a la estructura tridimensional de biomoléculas, poniendo especial énfasis en sus cualidades complementarias y también en sus limitaciones.

La técnica de difracción de rayos X se fundamenta en la interacción de las moléculas en estudio con radiación electromagnética de longitud de onda suficientemente pequeña, para poder revelar los detalles de un objeto a nivel de resolución atómica. Esto se puede lograr siempre y cuando se consigan cristales verdaderos de los compuestos en estudio, en razón de que requerimos una muestra con suficiente material para generar una señal detectable y debido a que la derivación de los datos necesita que las moléculas estén precisamente orientadas respecto al haz de rayos X. Un cristal cumple con estas características. La información presente en un conjunto de patrones de difracción, colectados en diversas orientaciones del cristal, constituye el juego de datos básicos para la inferencia de la estructura. En este punto surgen dos importantes consideraciones respecto a la calidad de los datos: por una parte, hasta qué resolución fue posible colectar datos; y por otra, qué tan completa fue la colección de estos datos. En un paso subsecuente, se requiere derivar las fases de cada reflexión, parámetros indispensables para la determinación de la estructura, y que no se pueden obtener directamente de los patrones de difracción. Este proceso puede ser difícil o imposible, y normalmente involucra la obtención de derivados del cristal en los que se asocien unos pocos átomos pesados; sin embargo, en los casos en que se dispone de una estructura muy similar, se puede intentar la técnica de reemplazo molecular, en la que se utiliza la estructura previamente determinada como base para obtener las fases. En una etapa final, se construye un modelo molecular alrededor de la densidad electrónica experimental y se refina el modelo en un procedimiento recursivo. En este punto encontramos el otro elemento importante en la calidad de una estructura cristalográfica, el llamado factor R, que indica la adecuación del modelo a los datos experimentales. En términos generales, se puede considerar que la resolución atómica (en la que se distinguen claramente las formas y posiciones de las cadenas laterales de aminoácidos, se pueden medir distancias precisas, deducir puentes de hidrógeno, etc.) empieza alrededor de los 2 o 2.5 angstroms y con un factor R de menos de 20%. La técnica de cristalografía de rayos X rinde información detallada y directa sobre la estructura y, aunque se obtiene a partir de condiciones que pueden ser alejadas de las fisiológicas (por ejemplo, presencia de cosolventes y precipitantes), se ha observado por multitud de datos que refleja muy cercanamente la conformación biológicamente relevante.

En años más recientes, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear ha podido emplearse para la deducción de estructuras macromoleculares. Esta capacidad deriva de los avances en los equipos, con nuevas fuentes de campo magnético que dependen de superconductores, así como de la incrementada capacidad computacional para el control del experimento y para la colección y procesamiento de los datos. Experimentos de NMR de dos, tres y cuatro dimensiones (cada dimensión significa una condición experimental dada), permiten la medición de distancias entre átomos (hi-

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear ha podido emplearse para la deducción de estructuras macromoleculares.

drógeno, o bien isótopos de masa impar de nitrógeno o carbono), sea a través del espacio (experimentos tipo NOESY, utilizando efecto nuclear Overhauser) o a través de los enlaces químicos (experimentos tipo COSY, espectroscopia correlacionada). Con un número suficiente de estas distancias aproximadas, es posible construir modelos en los que se intente satisfacer a todas las distancias simultáneamente, y que también satisfagan todos los constreñimientos adicionales, tales como distancias y ángulos de enlace que tendría una estereoquímica correcta de la cadena polipeptídica. Los modelos derivados de NMR tienen la ventaja de realizarse en solución, por lo que se evitan las pequeñas distorsiones que induce la malla cristalográfica. Además, proveen información respecto a qué zonas de la proteína tienen mayor movilidad que otras, nuevamente en un estado más natural que el de un cristal. Quizá la más importante ventaja de la técnica de NMR es que no requiere la cristalización previa de la proteína, por lo que se han podido resolver estructuras que habían resultado recalcitrantes a la determinación por rayos X.

Con rayos X se han podido resolver estructuras de mucho mayor tamaño (más de 1000 aminoácidos), mientras que la NMR está limitada a un máximo de unos 200 residuos, pero sin necesidad de obtener cristales.

Las ventajas y desventajas de la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear en la determinación de estructuras macromoleculares les confieren atributos complementarios: con rayos X se han podido resolver estructuras de mucho mayor tamaño (más de 1,000 aminoácidos), mientras que la NMR está limitada a un máximo de unos 200 residuos, pero sin necesidad de obtener cristales; el detalle de una estructura cristalográfica de alta resolución se complementa con la capacidad de la NMR de proveer información sobre la dinámica de las proteínas (ver, por ejemplo, la sección sobre plegamiento de proteínas).

La información estructural de la que disponemos permite hacer una serie de observaciones y generalizaciones respecto a la arquitectura proteica. Dado que la mayoría de las estructuras resueltas a partir de cristales únicos y de NMR corresponden a proteínas globulares, la discusión más rica se puede dar al referirse a este tipo de proteínas. Existe, de cualquier modo, una buena cantidad de información estructural sobre proteínas fibrosas y han empezado a aparecer los primeros representantes de proteínas membranales con estructura detallada. En todos los casos, podemos describir la anatomía proteica de una manera jerárquica (figura 3-5a).

La llamada estructura secundaria se refiere a la observación recurrente de segmentos de cadena polipeptídica con estructura periódica.

La llamada estructura secundaria se refiere a la observación recurrente de segmentos de cadena polipeptídica con estructura periódica. Segmentos que contienen la célebre hélice alfa o las estructuras de láminas beta-plegadas representan casi siempre un porcentaje importante del total de una cadena polipeptídica en estado nativo. Estas estructuras secundarias se asocian entre sí de diversas maneras, en donde también podemos distinguir temas recurrentes. Un motivo estructural (o estructura supersecundaria) frecuente consiste, por ejemplo, en dos hebras beta, que corren paralelas, y se unen a través de una hélice alfa, todo esto en una topología de mano derecha (una estructura de este tipo se marca con el número 6 en la figura 3-5b). La yuxtaposición de estructuras secundarias y supersecundarias conforma glóbulos con un conjunto de residuos ocultos al solvente, que identificamos como estructura terciaria. En la sección sobre plegamiento de proteínas exploraremos las razones fisicoquímicas que nos permiten

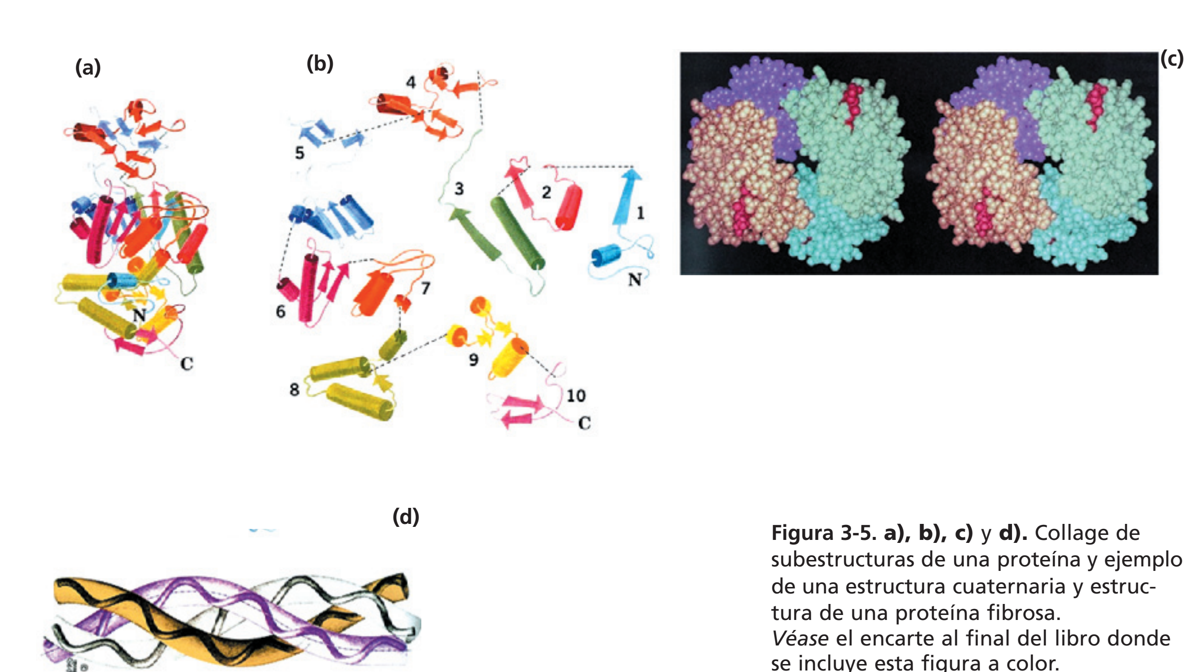


Figura 3-5. a), b), c) y **d).** Collage de subestructuras de una proteína y ejemplo de una estructura cuaternaria y estructura de una proteína fibrosa.
Véase el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

explicar, aunque sea *a posteriori,* las razones probables para esta anatomía. En cualquier caso, la observación de numerosas estructuras muestra de inmediato que, conforme una cadena polipeptídica se hace más larga, la estructuración tridimensional no sigue un patrón monótono para formar glóbulos cada vez más grandes. Lo que se observa es una segregación en dominios, es decir, unidades estructurales más o menos independientes. La identificación de estructuras supersecundarias y dominios, desde el punto de vista estructural, seguramente corresponde a un conjunto de condicionamientos fisicoquímicos, pero, igualmente importante, denota en muchos casos un linaje evolutivo. Es evidente, por la inspección de secuencias de muchas proteínas (como se ejemplificó arriba), que los dominios son verdaderas unidades evolutivas. La actividad de una proteína puede provenir de la interacción de dominios que comprenden, cada uno, una parte más o menos independiente de la función. En un terreno más especulativo, dominios proteicos esencialmente distintos, algunas de cuyas estructuras supersecundarias son muy similares, podrían haber sido ensamblados a partir de elementos comunes (minigenes) en las etapas más iniciales de la evolución molecular (que en algunos casos pueden corresponder con los exones en la estructura de los genes, figura 3-5b y capítulo 1). La probabilidad de formar entidades con estructura nativa y funciones novedosas a partir de elementos preexistentes es mucho mayor que la de obtener cada actividad nueva a partir de secuencias al azar.

Los dominios son unidades estructurales más o menos independientes.

Los dominios son verdaderas unidades evolutivas.

En numerosas ocasiones, los elementos globulares que se asocian para constituir la proteína funcional completa no provienen de una sola cadena polipeptídica. La asociación espontánea de varios polipéptidos da origen a la llamada estructura cuaternaria, en donde cada polipéptido se denomina subunidad. La evolución ha producido diversos arreglos, hermosamente simé-

La asociación espontánea de varios polipéptidos da origen a la llamada estructura cuaternaria, en donde cada polipéptido se denomina subunidad.

tricos, de subunidades idénticas o diferentes, para construir proteínas multiméricas. Existe un valor adaptativo en este tipo de configuraciones, notablemente la capacidad de comunicar los efectos de la interacción molecular, en una de las subunidades, a otras de la proteína multimérica, para lograr una regulación muy fina de su actividad (figura 3-5c).

Las proteínas fibrosas tienen en común estar constituidas por secuencias monótonas o repetitivas.

Las proteínas fibrosas tienen en común estar constituidas por secuencias monótonas o repetitivas, incapaces de determinar una conformación nativa globular, pero muy eficientes en asociarse, de manera longitudinal, en fibras cuyas propiedades dependen de su composición. Esta situación es similar a la que se observa en los materiales fibrosos manufacturados por la industria química. Las propiedades del nilón dependen fundamentalmente de su peso molecular y del tipo de monómeros empleados. En el caso de las biomoléculas fibrosas, estas propiedades pueden ser controladas por ligeras, pero muy específicas diferencias de secuencia, codificadas en los genes respectivos. En los ejemplos clásicos de proteínas fibrosas notamos estas características (figura 3-5d y cuadro 3-3).

Cuadro 3-3

Proteína	Repetición	Propiedades
α-queratina	Pseudorepetición de 7 aminoácidos	Se estructura en hélices α enrolladas entre sí. Forma parte del pelo, uñas, etc.
Fribroína de la seda	$(Gly\text{-}Ser\text{-}Gly\text{-}Ala\text{-}Gly\text{-}Ala)_n$	Forma láminas beta, en las que se intercalan los grupos metilo de alanina con los huecos de la glicina
Colágena	Variantes de $(Gly\text{-}Pro\text{-}Hyp)_n$ donde Hyp denota hodroxiprolina	Se estructura en triples superhélices de hélices izquierdas. Forma parte de tendones y otros tejidos conectivos

Las proteínas membranales constituyen un grupo de interés determinante, en razón a la importancia de sus funciones y su implicación en innumerables procesos fisiológicos normales y patológicos. Las membranas biológicas están constituidas en proporción significativa por proteínas, con la característica notable de establecer un ambiente anfipático (con zonas hidrófobas e hidrofílicas) y un efecto posicional (o vectorial, donde existe adentro y afuera). Las proteínas más fuertemente asociadas a las membranas (proteínas integrales) están constituidas o contienen un componente que atraviesa la membrana de lado a lado. Así, constituyen elementos centrales en la comunicación celular. Los canales iónicos, diversos receptores de factores y hormonas, y las proteínas encargadas de la adherencia y la movilidad de la célula, son proteínas membranales. Las estructuras cristalográficas de un puñado de proteínas integrales de membrana (figura 3-6) confirman que éstas se constituyen de los mismos elementos de estructura secundaria (hélices α y láminas β), que en estos casos presentan una alta hidrofobicidad y son más estables embebidas en la membrana. La necesidad

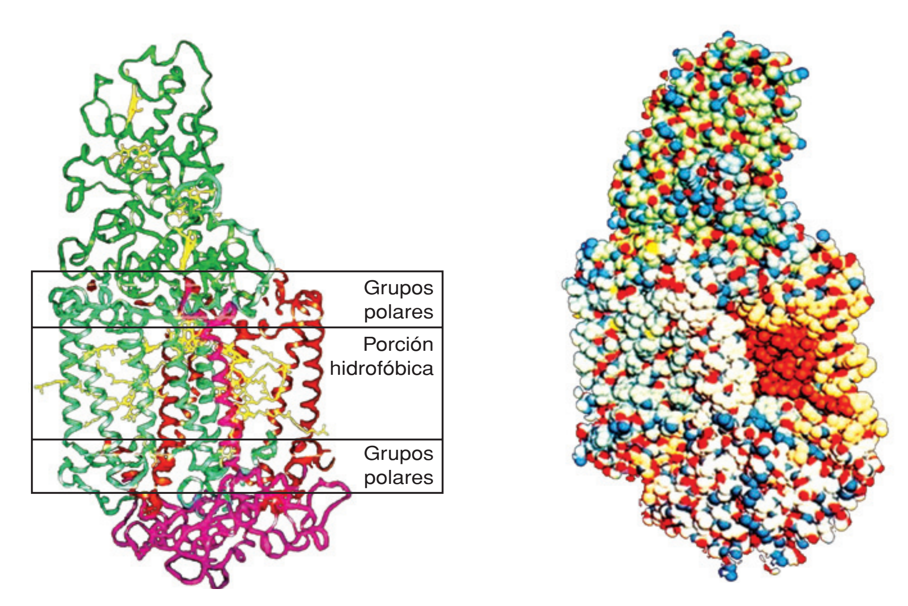


Figura 3-6. Centro reactivo fotosintético (proteína membranal).
Véase el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

de conocer un número mucho mayor de estructuras de proteínas membranales se puede resaltar, si tomamos en cuenta que alrededor de 25% de las proteínas predichas a partir del análisis de genomas completos son proteínas de este tipo. Por otro lado, parece ser que la capacidad de predicción estructural gruesa, para proteínas membranales, es más sencilla y confiable que para proteínas globulares.

Plegamiento de proteínas

En esta sección discutiremos algunos de los principios que subyacen en la adopción de una conformación nativa en las proteínas, así como la manera en que alcanzan esta conformación, a partir de su biosíntesis en los ribosomas, o de un estado experimental desnaturalizado. La investigación en este campo podría situarse en dos grandes aspectos o preguntas, que podríamos identificar con la termodinámica y la cinética, respectivamente, del plegamiento de proteínas: ¿cuál es la naturaleza y la magnitud de las interacciones no covalentes que determinan cómo se conforma una proteína? ¿En qué orden o secuencia temporal se establecen estas interacciones, de tal manera que las proteínas adquieran su conformación nativa en tiempos compatibles con su función biológica?

Respecto a la primera pregunta, está claro que, al aproximarnos a su solución, contaremos con la herramienta adecuada para analizar las estructuras determinadas experimentalmente, así como sus interacciones con otras proteínas y ligandos pequeños. Adicionalmente, responder a esta pregunta es una condición necesaria para poder predecir, con base en principios fundamentales, la conformación nativa de una proteína, a partir de su secuencia.

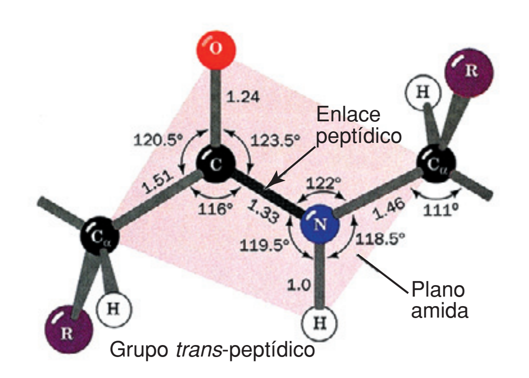
La segunda pregunta surge de la observación que hoy llamamos la paradoja de Levinthal. Si consideramos que cada aminoácido puede adoptar 10 conformaciones distintas (un cálculo conservador), entonces para una proteína pequeña, de 100 aminoácidos, se requeriría visitar 10^{100} diferentes conformaciones para agotar su espacio conformacional. Éste es un número astronómico de conformaciones que, en los tiempos del movimiento molecular, la proteína de 100 aminoácidos no podría visitar en un tiempo equivalente a la edad del universo. La mayoría de las proteínas se pliegan (adquieren su conformación nativa) en intervalos que van desde milisegundos hasta unos cuantos segundos. La búsqueda de solución para esta paradoja constituye el efervescente campo del plegamiento de proteínas. Forzosamente, deben existir vías de plegamiento o etapas en las que ciertas interacciones, que se forman rápidamente, condicionan las etapas subsecuentes. De nuevo, la comprensión de este proceso tiene grandes implicaciones y constituye una herramienta promisoria (quizá indispensable) para lograr la predicción de estructura a partir de secuencia, atendiendo a principios fundamentales.

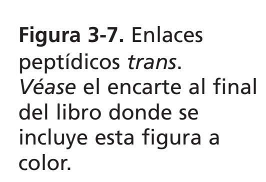
> La asociación de los aminoácidos, en la estructura polimérica lineal de las proteínas, ocurre a través del enlace peptídico.

> Los enlaces peptídicos se forman casi siempre en *trans* en el ribosoma.

La asociación de los aminoácidos, en la estructura polimérica lineal de las proteínas, a través del enlace peptídico, establece un primer conjunto de condiciones que deben tomarse en cuenta para comprender sus propiedades. La función amida del enlace peptídico, por su carácter parcial de doble enlace, se estructura de manera plana y se puede configurar como *cis* o *trans* (figura 3-7). Aunque asumimos fundadamente que los enlaces peptídicos se forman siempre *trans* en el ribosoma, existen proteínas cuya conformación nativa contiene alguno o algunos enlaces peptídicos en configuración *cis*. Otra observación importante es que una función amida contiene un protón enlazado al nitrógeno y dos pares de electrones libres en el oxígeno, cuya capacidad de establecer puentes de hidrógeno determina la estabilidad relativa de ciertas conformaciones donde se forman este tipo de enlaces. La formación de estructuras secundarias (es decir, periódicas) es probablemente la mejor manera de mantener satisfechos los puentes de hidrógeno, que en un polipéptido extendido se formarían con el agua y que en la conformación nativa se encuentran en su interior.

La formación de una estructura nativa (que en realidad significa un conjunto de conformaciones que fluctúan ligeramente alrededor de una




Figura 3-7. Enlaces peptídicos *trans*. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

estructura promedio) depende de la secuencia de aminoácidos, debido a que la naturaleza fisicoquímica de éstos contribuye a establecer un conjunto de interacciones específicas. En este sentido, debemos observar que existen aminoácidos hidrófobos e hidrofílicos, grandes y chicos, capaces de formar puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Entre todas las interacciones posibles para las cadenas laterales de los aminoácidos, existe buena evidencia para suponer que la más importante para determinar la estructura proteica es la interacción hidrófoba. Podemos imaginar a una cadena polipeptídica como un largo collar que contiene, en algunas de sus posiciones, gotitas de aceite y, en otras, entidades solubles en agua. Al colocar tal filamento en agua, las gotitas de aceite tenderían a colapsarse para formar gotas más grandes, contorsionando en consecuencia a la cadena. Las interacciones hidrófobas serían la fuerza motriz de la contorsión, pero implicarían el ocultamiento de los enlaces peptídicos, por lo que un colapso hidrófobo, en el que se mantienen los puentes de hidrógeno, por medio de estructuras secundarias, sería más estable. Asimismo, las interacciones en el interior de la proteína nativa contribuirán a su estabilidad en la medida en que "embonen" óptimamente, es decir, que dejen pocos espacios vacíos. Por último, la presencia de cadenas laterales que completan puentes de hidrógeno que no se pudieron satisfacer en la estructura secundaria, así como otras que contribuyen a la solubilidad (por ejemplo, quedando con carga electrostática en la superficie), serían otros factores importantes para obtener una estructura nativa específica y estable.

La descripción anterior se refiere a conceptos cualitativos bastante bien aceptados en relación a los parámetros fisicoquímicos que intervienen en el plegamiento de proteínas. Evidentemente, para poder utilizar estos conceptos en el proceso de predicción de estructura, se requiere contar con el componente cuantitativo y preciso de las magnitudes de estos parámetros, aunado a una capacidad fuerte de simular el proceso mismo de plegamiento. En este sentido, es bien reconocido que un análisis local, entre los aminoácidos vecinos más próximos, sólo permite anticipar, con una confiabilidad máxima de 70%, incluso la estructura secundaria de las proteínas. Lo anterior se debe probablemente a la influencia de elementos distantes de la cadena polipeptídica en la conformación de muchos de los elementos de estructura secundaria. Es decir, las interacciones entre unos y otros segmentos, no adyacentes, de una proteína, determinan la adopción de una u otra conformación en el nivel de estructura secundaria. Por otro lado, se reconoce que la energía libre asociada al plegamiento nativo de la mayoría de las proteínas es de una magnitud relativamente modesta (menos de 15 Kcal/mol), pero que resulta de la diferencia entre un gran número de componentes que contribuyen a desestabilizarla (notablemente, una disminución drástica de la entropía de la cadena polipeptídica) y otros que contribuyen a estabilizarla. Así, la suma algebraica de numerosos términos tiene el efecto de amplificar cualquier error sistemático y, en todo caso, de establecer una situación en la que la relación entre el ruido y la señal es poco favorable. En cualquier caso, cabe destacar que la concepción del proceso de plegamiento, es decir, la existencia y naturaleza de los intermediarios

Las interacciones entre unos y otros segmentos, no adyacentes, de una proteína, determinan la adopción de una u otra conformación en el nivel de estructura secundaria.

que determinan que éste se pueda dar en un tiempo compatible con la vida celular, ha experimentado un progreso sostenido durante las últimas décadas. En particular, el trabajo más reciente parece indicar que, además de seleccionarse secuencias de proteínas compatibles con una determinada estructura y función nativas, la selección natural pudiera operar constantemente en la "plegabilidad" de estas secuencias, es decir, en que sean precisamente capaces de plegarse en tiempos relativamente cortos. Experimentos recientes de simulación sugieren que las proteínas naturales se pliegan rápidamente porque su "paisaje" energético es tal que existe una tendencia más o menos continua a transitar hacia la estructura nativa, partiendo desde innumerables conformaciones alternativas con menor grado de estructuración. Este paisaje se podría conceptualizar como un embudo relativamente liso en donde el camino es descendente desde cualquier posición, y donde la conformación nativa está en el fondo del embudo. Queda por resolver la aplicación efectiva de esta conceptualización a los algoritmos de simulación de plegamiento en sistemas complejos más parecidos a las proteínas naturales.

Por todo lo anterior, se puede anticipar que la solución rigurosa del problema del plegamiento de proteínas se encuentra aún muy distante, y que habremos de conformarnos con descripciones cualitativas y modelos empíricos durante un buen número de años.



Reconocimiento molecular y catálisis

Las estructuras nativas de las proteínas determinan que la cadena polipeptídica presente arreglos o constelaciones de residuos de aminoácido, en posiciones definidas en el espacio tridimensional. Más aún, determinadas regiones de la superficie de una proteína pueden contener densidades de carga electrostática influidas por la estructura completa de la proteína (por ejemplo, por los macrodipolos presentes en las hélices α). Así mismo, la red de interacciones entre los diversos elementos de estructura determinan mayor o menor flexibilidad en segmentos específicos de la cadena polipeptídica. La superficie de una proteína globular, con sus hendiduras y movimientos locales, constituye un tapiz en el que la naturaleza puede dibujar innumerables patrones. Estos patrones específicos de entidades hidrófobas o con carga electrostática, donadoras o aceptoras de puentes de hidrógeno, permiten establecer una complementariedad, en forma y propiedades, con moléculas grandes y pequeñas; determinan la capacidad de reconocimiento molecular. Los mismos principios que explican el plegamiento de las proteínas en sus estructuras nativas son aplicables a las interacciones que definen el reconocimiento específico de otras moléculas.

Las proteínas son capaces de exhibir una especificidad exquisita. Un canal iónico puede distinguir un ion sodio de un ion potasio, con afinidades que difieren en varios órdenes de magnitud. Similarmente, otras proteínas transportadoras discriminan perfectamente entre los aniones fosfato y sulfato. La mayoría de las polimerasas de ácidos nucleicos detectan simultáneamente la identidad del monómero (para ácido ribo o de-

soxirribonucleico, que difiere del otro por un grupo OH en posición 2') y su complementariedad con la secuencia molde. Sin embargo, es importante resaltar que la selección natural actúa para establecer la especificidad de las proteínas sólo en los puntos en que esto es funcionalmente útil. En el último ejemplo mencionado, es interesante notar que muchas de estas polimerasas pueden también utilizar monómeros que difieren en la posición 3', o que presentan una molécula de biotina (casi del mismo tamaño que el monómero en sí), sin reflejar una pérdida tan fuerte en su afinidad. Simplemente, no ha existido una presión selectiva para establecer interacciones específicas con estas áreas del sustrato, probablemente porque en las condiciones naturales no existen moléculas con las cuales confundirse.

La ya mencionada flexibilidad inherente a las proteínas, al tiempo que las hace muy versátiles, constituye un importante reto para el análisis del reconocimiento molecular, en la medida en que puede existir una adecuación inducida (*induced fit*), en la que la complementariedad de las formas entre una proteína y su ligando no existe de antemano, sino que se establece al darse las primeras interacciones.

En todo caso, los constantes avances en la comprensión y simulación de las interacciones moleculares auguran una creciente capacidad para utilizar la información estructural de proteínas con el fin de comprender también sus interacciones con otras sustancias y como elemento clave para el diseño de fármacos con base en la molécula blanco.



Relación secuencia-estructura-función (la "predicción" de estructura y función)

La convicción de que la secuencia de aminoácidos determina la estructura tridimensional de las proteínas genera de inmediato un deseo ferviente de predecir estructura a partir de secuencia; este problema constituye lo que algunos han llamado un segundo código genético, puesto que la función de los genes se expresa, primero, en la secuencia de las proteínas, de acuerdo con el código genético, pero la función sólo surge de la estructura que las proteínas adoptan, y que debería ser posible derivar a partir de la secuencia. Más aún, incluso la estructura en sí misma no revela directamente la función de la proteína, por lo que el problema verdadero de deducir función a partir de secuencia es todavía más complicado. Es evidente que, en tanto la estructura y la función de las moléculas depende de sus propiedades fisicoquímicas, la comprensión cabal de estas propiedades y de los principios que las relacionan debería ser suficiente para transitar de una secuencia a una función, y viceversa. La realidad actual es que el problema de la relación secuencia-estructura-función en proteínas está a una gran distancia de ser resuelto, a pesar de los constantes avances, conceptuales y metodológicos, que se hacen en el campo.

Vale la pena tratar aquí, sin embargo, algunas de las maneras como se ha abordado este problema, y el tipo de logros que se han alcanzado hasta el momento.

Abundando en un concepto de gran utilidad que se mencionó antes, un sencillo cálculo nos revela que el número de posibles secuencias de proteínas distintas, digamos con un tamaño de 100 aminoácidos, es igual a 20^{100}, un número a todas luces gigantesco. Como conclusión, podemos ver fácilmente que la probabilidad de obtener, por un proceso azaroso, dos secuencias de 100 aminoácidos idénticas es despreciablemente pequeña. Por este mismo principio, la probabilidad de que dos secuencias con un parecido detectable, pero no idénticas, hayan surgido independientemente, resulta despreciable en segmentos relativamente largos de proteínas (digamos, 100 aminoácidos) con más de 25% de residuos idénticos (o bien, ¡75% de residuos distintos!). Esta noción puede no ser muy intuitiva, pero subyace en uno de los conceptos más poderosos del análisis funcional de proteínas en la actualidad: la inferencia de función por homología. Si contamos con la secuencia de una proteína, de la cual desconocemos su función, el primer paso obligado es la inspección de las bases de datos de secuencia, para detectar alguna otra secuencia con suficiente parecido. Si se encuentra tal secuencia, de inmediato podemos inferir que la función de nuestra proteína problema está relacionada (incluso cercanamente) con la proteína homóloga detectada. Se puede decir que hemos resuelto el problema de "predecir" función, a partir de la secuencia. Y, paradójicamente, esta identificación puede prescindir de la estructura, puesto que tenemos conocimiento funcional de muchas proteínas de las que desconocemos la estructura.

En la actualidad, estos métodos para analizar la secuencia de proteínas (deducida de la secuencia nucleotídica de los genes que las codifican) han cobrado extraordinaria relevancia en el contexto de los proyectos genómicos. A partir de la propuesta y puesta en marcha del proyecto del genoma humano (que se esperaba terminar en el año 2005 pero cuyo primer borrador se adelantó y se publicó en el 2001), también se han ido terminando las secuencias completas de los genomas de organismos más pequeños, y se dispone así del catálogo completo de los genes que los constituyen. El papel de las herramientas computacionales de análisis se ha tornado cada día más crucial. Podemos observar con satisfacción que la investigación moderna acerca de las proteínas se da en un contexto en el que inevitablemente tendrían que haber estado, dentro del gran principio unificador en biología: la evolución.



Referencias bibliográficas

Branden, C. y Tooze, J., *Introduction to Protein Structure,* Garland Publishing, Nueva York, 1991.

Creighton, T.E., *Proteins: Structures and Molecular Properties,* Freeman, 2a., ed., ISBN ASIN, Nueva York, 0716723174, out of print, 1993.

Voet, D. y Voet, J., *Bioquímica,* Ediciones Omega, S.A., Barcelona, España, ISBN 84-282-0906-5, 4, 6, 7 y 8, 1992.

CAPÍTULO 4

CONTROL DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN EUCARIONTES

Félix Recillas Targa ■ Mario Enrique Zurita Ortega



Introducción

Los avances técnicos han permitido a los investigadores abordar preguntas que pretenden explicar cómo una célula adquiere y mantiene una identidad genética propia. El centro de dichas preguntas consiste en conocer el papel que desempeñan los complejos multiproteicos en conjunto con el DNA, en el núcleo de una célula eucarionte. Ésta es una de las preguntas más relevantes dentro de la biología moderna.

En las últimas décadas, se ha generado un abundante conocimiento relacionado con la regulación transcripcional tejido-específica de los genes (McKnight y Yamamoto, 1992; McKnight, 1996; Lemon y Tjian, 2000). Dicha regulación genética está mediada a través de interacciones entre secuencias reguladoras específicas en el DNA y factores transcripcionales específicos de un tejido o de una etapa, en el desarrollo de un organismo, en el cual debe expresarse un gen.

Como elementos básicos de regulación se han definido los promotores que representan regiones en el DNA cercanas al sitio de inicio de la transcripción de un gen, donde la acción coordinada de múltiples factores proteicos colaboran para reclutar a las diferentes RNA-polimerasas, formando el complejo de iniciación y, así, transcribir un gen. En los organismos eucariontes existen tres tipos de RNA-polimerasas. En particular, la RNA-polimerasa II es la responsable de la transcripción de la mayoría de los genes que codifican para proteínas (Struhl, 1996). A su vez, toda esta información se encuentra contenida en los cromosomas. Por otra parte, además de los promotores existen otros elementos dentro del DNA que tienen capacidad de modular la actividad transcripcional de un gen. Estos elementos son capaces de modular positiva o negativamente la acción de un promotor y, consecuentemente, regular la tasa de expresión de un gen. Estos elementos han sido denominados "estimuladores" (*enhancers*) y "silenciadores" (*silencers*), siendo los primeros fomentadores de la transcripción, mientras que los segundos abaten la expresión de un gen. Además, en diversos sistemas genéticos se han identificado regiones de regulación a distancia. El caso

> La regulación genética está mediada a través de interacciones entre secuencias reguladoras específicas en el DNA y factores transcripcionales específicos de un tejido o de una etapa.

> Como elementos básicos de regulación se han definido los promotores que representan regiones en el DNA cercanas al sitio de inicio de la transcripción de un gen.

> Además de los promotores existen otros elementos dentro del DNA que tienen capacidad de modular la actividad transcripcional de un gen. Estos elementos han sido denominados "estimuladores" (*enhancers*) y "silenciadores" (*silencers*).

más estudiado es el de los genes de la globina en humano, en el cual, un grupo de genes se expresan en tiempo y espacio por elementos de regulación situados a gran distancia. De los elementos de regulación a distancia surge la pregunta que cómo pueden ser funcionales y cómo pueden influir en la expresión diferencial de un gen. De lo anterior, se presenta una de las hipótesis más aceptadas, aunque, a la fecha, son pocas las evidencias experimentales que apoyan a la misma. Esta hipótesis propone que los sitios de hipersensibilidad que pueden tener funciones reguladoras tipo estimulador o silenciador ejercen su acción sobre el promotor del gen a regular, mediante la formación de asas cromatinianas, es decir, mediante la generación de estructuras tridimensionales que acercan estos elementos de regulación localizados a distancia con los promotores individuales, y mediante un juego, o mejor dicho, una combinación de factores de transcripción, se pueda regular de manera específica la expresión del gen en cuestión.

Los cromosomas representan las estructuras más grandes, visibles físicamente, que contienen la información genética de una célula. Una de las más interesantes propiedades de los cromosomas es la compactación del DNA en células de origen eucarionte antes de su división. Se sabe que el genoma humano, por ejemplo, está constituido por 3,300 millones de pares de bases, comprendidos en alrededor de 2 metros lineales de DNA. De lo anterior surge la pregunta: ¿Cómo es posible que un gen pueda ser accesible a la maquinaria transcripcional, es decir, que la cromatina pueda compactarse y descompactarse de manera regulada, en el momento apropiado, a lo largo de la vida de una célula? Hoy en día, el control de la expresión genética no puede entenderse si no se toma en cuenta el contexto cromosómico y nuclear de una célula. Existen evidencias bioquímicas y genéticas que indican que la estructura de la cromatina desempeña un papel activo en la transcripción (Felsenfeld, 1996; Lemon y Tjian 2000; West y cols., 2002).

El control de la expresión genética no puede entenderse si no se toma en cuenta el contexto cromosómico y nuclear de una célula.

La estructura de la cromatina relacionada con estos genes también posee una organización regulada de manera tejido-específica (Van Holde, 1989). En la actualidad se han podido definir experimentalmente dominios genéticos, compuestos por unos o varios genes, que son transcripcionalmente activos. Esto se ha definido mediante la accesibilidad y sensibilidad al corte del DNA, por parte de endonucleasas como la DNasa I, lo cual sugiere que en dicha región del DNA existe accesibilidad derivada de una estructura de la cromatina más laxa o descompactada. De lo anterior, junto con evidencias citológicas, surge la idea de que el genoma eucarionte se encuentra organizado en dominios activos e inactivos transcripcionalmente, definidos los primeros como regiones de eucromatina, mientras que los segundos son conocidos como zonas de heterocromatina (Van Holde, 1989; Levy-Wilson y Fortier, 1989; Felsenfeld, 1996; West y cols., 2002). Resulta relevante señalar que la regulación de los episodios relacionados con la descompactación de la cromatina deben ser los primeros procesos que van a determinar que un factor o un grupo de factores transcripcionales puedan de manera específica interactuar con sus secuencias blanco en el DNA e influir en la expresión transcripcional del gen que va a ser regulado. Por lo tanto, la estructuración del DNA en cromatina puede claramente ser considerada como un mecanismo fino de regulación, previo al proceso transcrip-

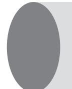
El genoma eucarionte se encuentra organizado en dominios activos e inactivos transcripcionalmente, definidos los primeros como regiones de eucromatina, mientras que los segundos son conocidos como zonas de heterocromatina.

cional, y que debe desempeñar un papel particular en la especificidad de expresión de un gen (Felsenfeld, 1996).

En la actualidad, no podemos imaginar la regulación de la expresión genética sin antes mirar el contexto cromosómico en el cual un gen o un grupo de genes se encuentra (Struhl, 1996). Los cromosomas tienen la información necesaria que permite, de manera totalmente regulada, prender o apagar un gen, controlar su propia duplicación, reparación y empaquetamiento en el interior del núcleo. A su vez, no podemos olvidar que la cromatina debe proveer la información necesaria para llevar a cabo el complejo movimiento y migración que deben realizar los cromosomas durante la mitosis y la meiosis.

Los cromosomas tienen la información necesaria que permite, de manera totalmente regulada, prender o apagar un gen.

El conocimiento generado en la actualidad en cuanto a la expresión diferencial de los genes, a lo largo del desarrollo y la estructura de la cromatina, nos lleva a poner en evidencia nuevos niveles de regulación de la expresión genética. De lo anterior surge el interés por conocer más a fondo esta relación para entender mejor, en un contexto cromosómico y, por lo tanto, más apegado a lo natural, cómo un gen se expresa de manera diferencial a lo largo del tiempo y del espacio. En este capítulo estudiaremos cómo se lleva a cabo el inicio de la transcripción en células de origen eucarionte, completándolo con algunos aspectos de la estructura de la cromatina y organización nuclear que tienen una relación con la regulación diferencial de la expresión genética, a lo largo del desarrollo.



La transcripción por parte de las diferentes RNA-polimerasas

La regulación coordinada, en tiempo y espacio, de la expresión de los genes es esencial para un adecuado crecimiento y desarrollo de un organismo. No resulta sorprendente imaginar la importancia que tiene la transcripción de genes que codifican para proteínas como un proceso altamente regulado. Un gran número de laboratorios de investigación en todo el mundo se ocupan del estudio de la maquinaria molecular responsable de la síntesis del RNA mensajero (mRNA), en células eucariontes.

En la mayoría de los promotores, la polimerasa realiza varias rondas de iniciación de manera abortiva, produciendo pequeños transcritos, antes de escaparse, tomar el molde e iniciar la síntesis de un transcrito completo. El movimiento que realiza la polimerasa, alejándose del sitio de inicio de la transcripción, se conoce como el episodio de *promoter clearance* o abertura del promotor. La mayoría de estos episodios están relacionados con las secuencias de DNA que conforman al promotor y a las interacciones con factores transcripcionales. Además, existen los elementos de regulación a distancia, como los estimuladores y los silenciadores, que modulan cada uno de estos episodios, incrementando o disminuyendo la tasa transcripcional (Buratowski y Sharp, 1992; Blackwood y Kadonaga, 1998).

En células eucariontes, la transcripción se realiza con base en la actividad de tres diferentes tipos de polimerasas, las RNA-polimerasas I, II y III, cada una de las cuales transcribe diferentes grupos de genes. Los genes de

En células eucariontes, la transcripción se realiza con base en la actividad de tres diferentes tipos de polimerasas, las RNA-polimerasas I, II y III.

cada uno de estos grupos tienen, en su región promotora, al menos dos elementos: los elementos que constituyen el promotor basal y los elementos moduladores o proximales del promotor (Smales, 2001). Los elementos basales del promotor son necesarios y suficientes para determinar la especificidad de una de las RNA-polimerasas, además de dirigir niveles bajos o basales de transcripción. Los elementos basales del promotor son en un inicio reconocidos por un grupo específico de factores de transcripción, los cuales tienen la función de reclutar y concentrar a la RNA-polimerasa necesaria para la transcripción del gen. Dada la presencia en una célula de tres tipos distintos de RNA-polimerasas, la especificidad en el reclutamiento está dada por combinaciones particulares de factores transcripcionales, además de diferentes secuencias blanco en el DNA. Por su parte, los elementos moduladores incrementan o reducen los niveles basales de transcripción de manera específica. A continuación describiremos las diferentes polimerasas con sus correspondientes secuencias reguladoras o promotoras, poniendo cierto énfasis en la RNA-polimerasa II y sus factores asociados.

Los elementos basales del promotor son en un inicio reconocidos por un grupo específico de factores de transcripción, los cuales tienen la función de reclutar y concentrar a la RNA-polimerasa necesaria para la transcripción del gen.

La transcripción por medio de la RNA-polimerasa I

La RNA-polimerasa I (Pol I) se encarga de transcribir los genes ribosomales 5.8S, 18S y 28S (rRNA). Los genes ribosomales son los que codifican para rRNA que, al ensamblarse con proteínas de la célula eucarionte, conforman al ribosoma, organelo celular responsable de la traducción del RNA mensajero y síntesis o formación de proteínas celulares (figura 4-1).

La RNA-polimerasa I (Pol I) se encarga de transcribir los genes ribosomales 5.8S, 18S y 28S (rRNA).

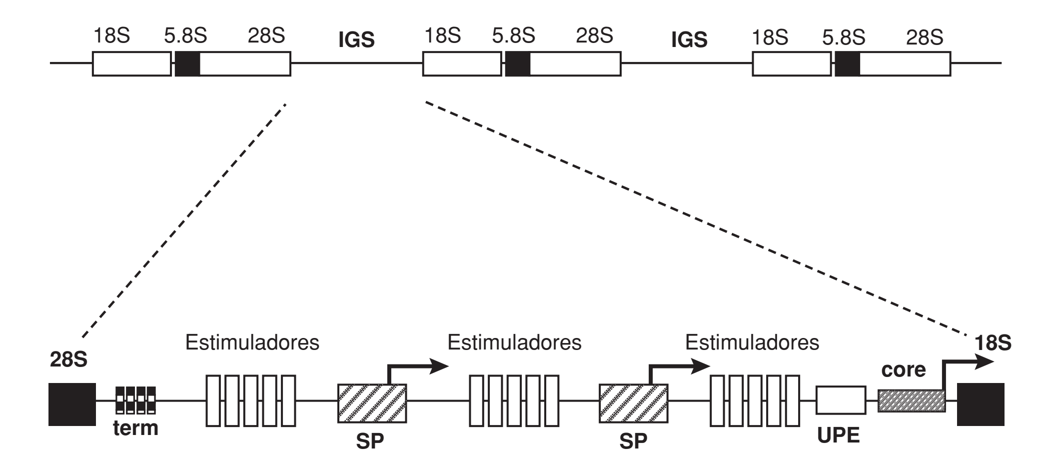


Figura 4-1. Organización genómica de las repetidas ribosomales y la región espaciadora intergenética (IGS). Los elementos de regulación localizados en la región espaciadora intergenética son complejos e incluyen una serie de elementos como terminadores (term) que aseguran la independencia transcripcional de cada unidad ribosomal. Hay una serie de estimuladores con sus respectivos promotores, conocidos como promotores espaciadores (SP), el elemento "río arriba" del promotor (UPE) y finalmente el centro o *core* del promotor. Todos estos elementos aseguran una expresión óptima de los genes ribosomales.

Los promotores que reconocen a la RNA-polimerasa I dirigen la transcripción de la mayoría de los genes ribosomales (rRNA); por lo general, no contienen caja TATA (Roeder 1992; Paule y White, 2000). A su vez, los promotores ribosomales humanos se componen de un elemento central que traslapa el sitio de inicio de la transcripción y de un elemento de control "río arriba" del inicio (*upstream control element* o UCE), localizado a –100 pares de bases (pb) del sitio de inicio y fomenta los niveles de transcripción de 10 a 100 veces (figura 4-1). La transcripción de estos genes ribosomales requiere, además de la RNA-polimerasa I, de la acción concertada de dos factores peptídicos: el factor UBF (*upstream binding factor*) y el factor selectivo 1 o SL1, el cual incluye a la proteína TBP (Roeder, 1992; Paule y White, 2000). UBF ha sido purificado y su DNA complementario (DNAc) aislado y caracterizado, tanto en humano como en *Xenopus*. Este factor se une de manera específica al elemento central, pero también al elemento UCE de los promotores ribosomales. Por su parte, SL1 se une de manera cooperativa con el UBF. Lo anterior ha dado pie a proponer que UBF se une primero al DNA, lo que provoca o induce el reclutamiento de SL1: estas interacciones incrementan considerablemente la formación del complejo de iniciación y, por lo tanto, la acción de la RNA-polimerasa I. En humano, el factor SL1 está constituido por la asociación entre TBP y un grupo de TAF de 48, 63 y 110 kDa que, como veremos más adelante, son factores accesorios que forman parte del complejo de iniciación (Comai y cols., 1992; Paule y White, 2000). Al parecer, las TAF son esenciales para las funciones del factor SL1, ya que estas funciones no pueden ser reemplazadas por la TBP sola. Aquí se sugiere que la asociación SL1-TAF es importante para reclutar a la TBP en promotores para la RNA-polimerasa I, a través de interacciones proteína-proteína con el UBF y con el mismo DNA. Se propone que las interacciones proteína-proteína con el UBF pueden inducir cambios conformacionales en el complejo SL1, favoreciendo la acción de TBP o alguna de las TAF, para así unirse al DNA.

La transcripción de los genes ribosomales requiere, además de la RNA-polimerasa I, de la acción concertada de dos factores peptídicos: el factor UBF (*upstream binding factor*) y el factor selectivo 1 o SL1, el cual incluye a la proteína TBP.

La transcripción por medio de la RNA-polimerasa II

La enzima RNA-polimerasa II (Pol II) transcribe la gran mayoría de los genes que codifican para proteínas celulares, al igual que algunos genes denominados pequeños RNA nucleares o *small nuclear RNA* o snRNA o pRNAn. Estos últimos son pequeños RNA que conforman el complejo de procesamiento necesario para madurar un RNA premensajero a RNA mensajero maduro que serán transportados posteriormente del núcleo al citoplasma.

La enzima RNA-polimerasa II (Pol II) transcribe la gran mayoría de los genes que codifican para proteínas celulares, al igual que algunos genes denominados pequeños RNA nucleares o *small nuclear RNA* o snRNA o pRNAn.

En la actualidad se conocen, al menos, 70 diferentes proteínas que en forma de subunidades funcionan de manera concertada para regular la transcripción por parte de la RNA-polimerasa II (Lemon y Tjian, 2000). Al parecer, muchas de estas proteínas, conocidas como factores de transcripción, interactúan entre ellas de manera específica para favorecer la actividad transcripcional de un gen.

Se conocen, al menos, 70 diferentes proteínas que en forma de subunidades funcionan de manera concertada para regular la transcripción por parte de la RNA-polimerasa II.

Con base en técnicas de bioquímica, y en particular gracias al fraccionamiento por cromatografía, ha sido posible purificar y copurificar los

factores de transcripción antes mencionados. De esta manera, por una parte, con la ayuda de sistemas experimentales *in vitro,* mediante el uso de la levadura y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster,* se han podido realizar experimentos de genética que han permitido complementar las observaciones bioquímicas e ir identificando los factores específicos para cada una de las RNA-polimerasas y, en particular, para la RNA-polimerasa II (Albright y Tjian, 2000). El ejemplo más claro es el aislamiento a partir de células de cuatro principales fracciones de proteínas nucleares, denominadas A, B, E, F, H y D, F y E (figura 4-2). A partir de estas fracciones se ha podido demostrar que la RNA-polimerasa II requiere de las fracciones A, B y D. De éstas,

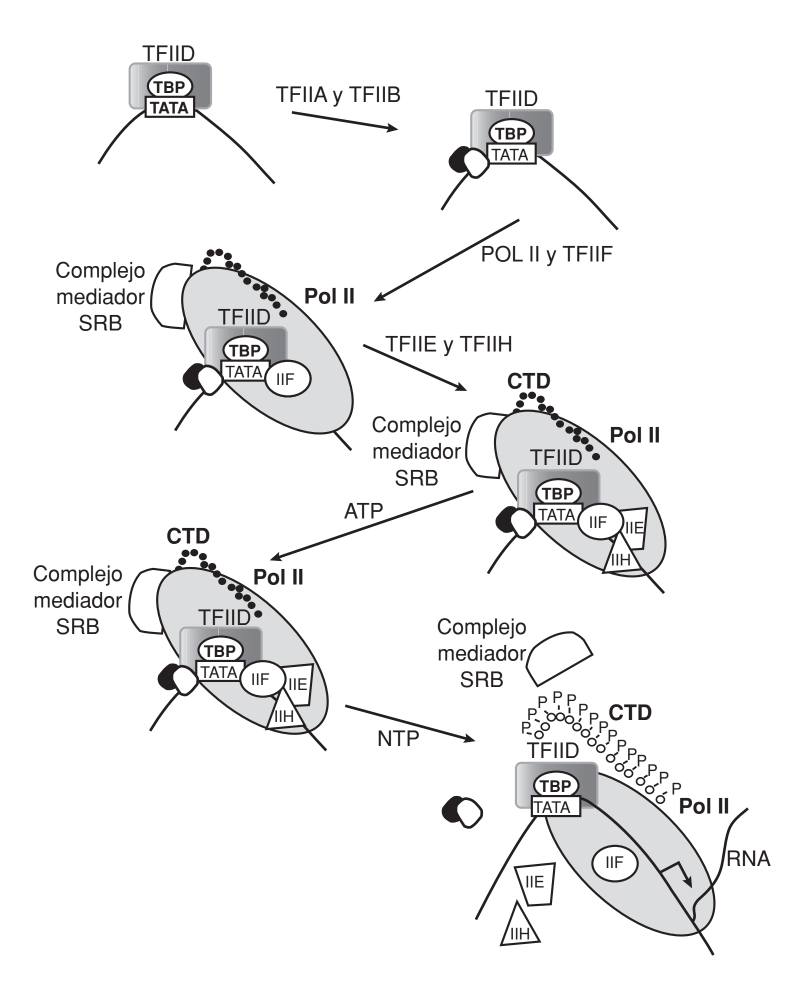


Figura 4-2. Modelo general para el inicio de la transcripción por parte de la RNA-polimerasa II. Este modelo apoya la idea de un ensamblaje secuencial de la maquinaria basal de la transcripción. Recordemos que TFIID está compuesto por TBP y una serie de TAF. Una vez asociado TFIID, se incorporan TFIIA y IIB los que, al parecer, determinan distancia y orientación para el ensamblaje de la RNA-polimerasa II escoltada por TFIIF al complejo de preiniciación de la transcripción. Cabe señalar que el complejo mediador-srb viene acoplado a la RNA-polimerasa II en su región C-terminal (CTD). Posteriormente se incorporan TFIIE y IIH, este último de suma importancia, dado que, en presencia de ATP y nucleótidos TFIIH, fosforila a la región CTD de la RNA-polimerasa II permitiendo así el inicio de la elongación y, por lo tanto, la síntesis del RNA.

la fracción D, denominada TFIID, es una de las más importantes, dado que tiene la capacidad de unirse a la secuencia TATA, conocida como caja TATA, secuencia que se encuentra presente en la gran mayoría de los promotores transcritos por la RNA-polimerasa II (Buratowski y Sharp, 1992; Lemon y Tjian, 2000; Orphanides y Reinberg, 2002). La transcripción por esta polimerasa comienza cuando la secuencia TATA, localizada en el centro de la región promotora, es reconocida por un factor transcripcional llamado *TATA-box binding protein* o TBP. A su vez, la TBP es uno de los componentes del complejo multiproteico conocido como TFIID (Roeder, 1998). La acción reguladora del complejo TFIID depende de la acción coordinada de otros factores transcripcionales conocidos como TAFs (*TBP associated factors*). La actividad de las TAFs permite de una manera muy organizada la función de otros seis complejos y, de esta manera, se forma el complejo de iniciación que a su vez permite reclutar a la RNA-polimerasa II e iniciar la transcripción. La formación del complejo de iniciación es un episodio extremadamente complejo donde participan múltiples factores peptídicos mediante interacciones DNA-proteína y proteína-proteína.

La caja TATA, es una secuencia que se encuentra presente en la gran mayoría de los promotores transcritos por la RNA-polimerasa II.

La subunidad funcional de la RNA-polimerasa II es capaz de catalizar las síntesis de RNA, pero es incapaz por sí sola de inducir de manera específica la transcripción de un gen. Son factores accesorios o factores de transcripción también llamados GTF (*general transcription factors*) de los cuales se han definido TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH, los que, en conjunto con la RNA-polimerasa II, le dan la posibilidad de reconocer e iniciar de manera específica la transcripción de un gen (Zawel y Reinberg, 1995; Roeder, 1998; Lemon y Tjian, 2000). En la actualidad, resulta difícil imaginar la estructura de este complejo. Limitantes técnicas no permiten resolver la estructura tridimensional de estos complejos, lo cual sería de gran ayuda para definir las interacciones entre componentes e incluso el orden de dichas interacciones. Por ejemplo, TFIID (compuesto por al menos 9 polipéptidos), TFIIE (por 2), TFIIF (por 2) y TFIIH (por 8) (Reinberg y cols., 1998).

La subunidad funcional de la RNA-polimerasa II es capaz de catalizar las síntesis de RNA.

Dentro de los genes transcritos por la RNA-polimerasa II existen diferentes tipos de promotores. Por ejemplo, no todos los promotores de genes transcritos por la RNA-polimerasa II tienen una caja TATA y un elemento iniciador. Además, las secuencias nucleotídicas de estos elementos, al igual que la distancia entre ellos, varía considerablemente. El hecho de que la parte central de este tipo de promotores tenga tal variabilidad sugiere que las interacciones entre factores transcripcionales y las secuencias de DNA de los promotores varían de promotor a promotor.

Las reglas generales que guían la actividad de estos promotores y la RNA-polimerasa II estarán dadas cuando se defina de manera precisa cómo son y en qué orden se llevan a cabo las interacciones DNA-proteína, en las diversas modalidades de promotores (Smales, 2001). Por lo tanto, las partes centrales de dos promotores no son, por lo general, idénticas, y hasta aquí resulta razonable postular que una o varias subunidades de la maquinaria transcripcional basal se unen a distintos elementos de dichos promotores, generando una alta variabilidad de respuesta. Recientemente, se ha apoyado la idea de que, además de la aportación por parte de los factores de trans-

cripción a la regulación transcripcional, la propia arquitectura de los promotores representa un componente más dentro de la regulación de la expresión de un gen.

La caja TATA

Los promotores para RNA mensajeros comunes se dividen en dos subgrupos generales: los que tienen la caja TATA y los que no la tienen.

Los promotores para RNA mensajeros comunes se dividen en dos subgrupos generales: los que tienen la caja TATA y los que no la tienen. En los promotores, además de la caja TATA, con frecuencia existen las llamadas secuencias iniciadoras que se localizan cercanas al sitio de inicio de la transcripción. Al parecer, la caja TATA, junto con las secuencias iniciadoras, es la responsable de reclutar a la TBP, formando un complejo con el TFIID. Experimentos *in vitro* han mostrado que la TBP, de manera individual, tiene la capacidad de interactuar con los componentes básicos de la maquinaria transcripcional.

Uno de los elementos del promotor más estudiado es la caja TATA, la cual se localiza comúnmente "río arriba" del sitio de inicio de la transcripción (entre –25 y –30 pb), pero no de todos los genes eucariontes transcritos por la RNA-polimerasa II. Una de las más importantes evidencias relacionadas con la importancia de la caja TATA es el descubrimiento de la unión de TFIID a esta secuencia. Estudios más detallados mostraron que una de las subunidades de TFIID, la proteína que se une a la secuencia TATA, es la proteína conocida como TBP. Se ha demostrado que TFIID es un complejo multipeptídico compuesto por al menos 9 subunidades, TBP y los factores asociados a TBP, conocidos como TAF (Goodrich y Tjian, 1994; Albright y Tjian, 2000). Estudios relacionados con TFIID en *Drosophila* sugieren que al menos dos subunidades interactúan con el DNA, teniendo una masa molecular de 60 y 150 kDa, respectivamente (Gilmour y cols., 1990; Albright y Tjian, 2000). La clonación del DNAc de la TAF, de 150 kDa, permitió realizar experimentos que demostraron la capacidad del dTAFII150 para unirse al DNA, en la región cercana al sitio de inicio de la transcripción del promotor tardío de adenovirus tipo 2(Ad2) (Verrijzer y cols., 1994). Por otra parte, la formación parcial de un complejo TFIID, compuesto únicamente por TBP, dTAFII150 y dTAFII250, dirigió, de manera selectiva, altos niveles transcripcionales utilizando un promotor canónico (Verrijzer y cols., 1995). Es importante señalar que TBP, de manera individual, es incapaz de inducir el inicio de la transcripción. Existen múltiples evidencias que señalan que TFIID contiene al menos dos proteínas que se unen al DNA, la TBP y la TAFII150, las cuales actúan en la región promotora y causan un efecto importante en el inicio de la transcripción.

Transcripción a partir de promotores sin caja TATA

La transcripción de promotores de mRNA que no tienen caja TATA dependen básicamente del elemento Inr (*initiator sequence*) o secuencia de inicio, la cual traslapa el sitio de inicio de la transcripción. Por lo general, las

secuencias Inr no comparten una homología en diferentes promotores, por lo que se piensa que existen diferentes familias de Inr. En el modelo presentado en la figura 4-2, apreciamos cómo proteínas específicas de la secuencia Inr (llamadas IBP) se unen en una primera instancia a esta secuencia realizando funciones similares a las de TBP, es decir, reclutando factores para el complejo de iniciación (Hernandez, 1993). En la actualidad, se han caracterizado varios factores tipo IBP (Hernandez, 1993). En realidad poco se sabe sobre el orden y los factores que conforman al complejo de iniciación en este tipo de promotores.

Mecanismos de activación

Varios son los pasos que deben tomarse en consideración para la formación del complejo de iniciación. En particular, los activadores en *trans* deben fomentar el inicio de la transcripción, facilitando la interacción de TBP con la caja TATA, acelerando el reconocimiento, por parte de factores de transcripción, al promotor o incrementando la estabilidad de TBP a variantes de afinidad de la caja TATA, lo cual incrementa el número de complejos de iniciación (Struhl, 1996).

El conjunto de episodios que llevan a la formación del complejo de iniciación incluye como primer paso la unión de TBP, en forma de TFIID, a la caja TATA. Dicha interacción puede ser favorecida por TFIIA, el cual interactúa con TBP en tres residuos de lisina localizados en la región repetida básica de TBP (Buratowski y Zhou, 1992; Lee y cols., 1992; Orphanides y cols., 1996; Reinberg y cols., 1998). Una vez que la TBP se une a la caja TATA, TFIIB seguida por la RNA-polimerasa II, la cual se encuentra asociada a TFIIF, se unen en conjunto al complejo de iniciación (figura 4-2). Después de la unión de la RNA-polimerasa II con TFIIF, TFIIE, TFIIH y TFIIJ, se incorporan al complejo de iniciación. Es en ese punto donde la transcripción puede dar inicio, siempre y cuando el complejo esté en presencia de trifosfatos ribonucleótidos, pero una modificación postraduccional de la RNA-polimerasa II es imprescindible para iniciar la transcripción (Zawel y Reinberg, 1995).

El extremo carboxilo-terminal (C-terminal) de la RNA-polimerasa II está constituido por un motivo repetido que puede ser altamente fosforilable (Dahmus, 1994). Se sabe que TBP interactúa únicamente con la forma fosforilada de la RNA-polimerasa II, que es la forma en la cual la polimerasa tiene la capacidad de entrar al complejo de iniciación (Usheva y cols., 1992). La forma de la polimerasa que se encuentra involucrada en la elongación transcripcional es la fosforilada, la cual predomina para el inicio de la transcripción, a partir de un promotor (Dahmus, 1994; Orphanides y cols., 1996), lo cual, en parte, parece estar dado por la disrupción de la interacción con la TBP (Usheva y cols., 1992). Más recientemente se ha demostrado que la región C-terminal no sólo es el blanco de la fosforilación por parte de TFIIH, sino también de otro conjunto modulador conocido como mediador/srb, el cual contribuye en funciones moduladoras de la transcripción, pero también tiene interacciones con remodeladores de la estructura de la

El extremo carboxilo-terminal (C-terminal) de la RNA-polimerasa II está constituido por un motivo repetido que puede ser altamente fosforilable.

cromatina, la cual se ve así asociada a la maquinaria transcripcional (Orphanides y cols., 1996; Orphanides y Reinberg, 2002).

El dominio carboxilo-terminal de la RNA-polimerasa II

A partir del descubrimiento, clonación y secuenciación de la subunidad grande de la RNA-polimerasa II, se ha puesto en evidencia la importancia del dominio carboxilo-terminal. Una de las primeras observaciones demostró que el dominio C-terminal es esencial para la función de la RNA-polimerasa II *in vivo*. Este mismo dominio se encuentra, de manera cíclica, covalentemente modificado, fosforilándose fuertemente en la región C-terminal (conocida como CTD), durante el proceso de inicio de la transcripción, para después hipofosforilarse justo antes de la iniciación de la transcripción (figura 4-2). Este dominio resulta un buen sustrato para una variedad de CDK (ciclinas dependientes de cinasas) y, de esta forma, tiene un vínculo con la regulación en la progresión del ciclo celular (Orphanides y Reinberg, 2002).

Uno de los factores generales de transcripción que se encuentra estrechamente ligado a la región C-terminal de la RNA-polimerasa II es TFIIH. Miembro del complejo de iniciación, es el responsable de la fosforilación de la región C-terminal de la RNA-polimerasa II y tiene una actividad de helicasa en sentido 5'-3' y 3'-5'. Dentro de las funciones de TFIIH se ha descubierto que una de las subunidades del TFIIH, la subunidad de 89 kDa, corresponde a la proteína ERCC3, encargada de reparar el DNA, es decir, de corregir errores en la secuencia de DNA; por lo tanto, el proceso de transcripción parece estar acoplado a la reparación del mismo DNA (Schaeffer y cols., 1993). La proteína ERCC3 es una DNA-helicasa, la cual tiene un papel esencial en el proceso de *nucleotide escission repair* (Weeda y cols., 1990). Ésta no es la única proteína del complejo TFIIH involucrada en la reparación. Se han caracterizado también otras subunidades de TFIIH con esta función. Esto implica una doble función del complejo TFIIH: la relacionada con la transcripción y la de reparación del DNA (Friedberg 1996; Sancar, 1996). Por otra parte, se ha visto que TFIIH es el blanco molecular para ciertos activadores. Una posibilidad es que la interacción entre un activador, o incluso un represor, con TFIIH, induzca cambios conformacionales en el DNA, derivados de la actividad de la helicasa de TFIIH, y forme un complejo abierto, causando un aumento o disminución de la transcripción, a partir de un promotor.

Recientemente se han identificado nuevas interacciones entre el dominio C-terminal y los factores de transcripción TFIIE, TFIIF y TFIIH, con su actividad CDK (McNight, 1996; Orphanides y Reinberg, 2002). Uno de los pasos es la asociación entre la RNA-polimerasa II y su dominio C-terminal no fosforilado, con el complejo de proteínas SRB. Sobre la base de esta observación, se ha dado en llamar a la RNA-polimerasa II y sus factores asociados la holoenzima (Orphanides y cols., 1996). Esta holoenzima, formada por varias subunidades, tiene la característica de responder a la acción de activadores, además de ser el componente central para el proceso de inicio de la transcripción. Las proteínas SRB, también conocidas como mediadores,

son las que se asocian a la polimerasa, completando la formación de la holoenzima (Koleske y Young, 1994; Orphanides y cols., 1996). Por lo general, la secuencia de ciertas proteínas SRB no tiene homología alguna con otras proteínas conocidas. Pero resulta claro que las proteínas SRB son esenciales para la actividad transcripcional, por parte de la RNA-polimerasa II. Al nuevo complejo formado por la RNA-polimerasa II y SRB se le añade una serie de factores de transcripción generales tipo TFIIB, TFIIH, TFIIE y TFIIF (McKnight, 1996). Por otra parte, actualmente no ha podido demostrarse de manera experimental una relación entre los complejos SRB/mediador/RNA-polimerasa II y TBP/TFIID, de manera independiente al promotor (figura 4-2). Es decir, la convergencia funcional de estos dos complejos está aparentemente dictada por el promotor. Después de la convergencia mencionada, se induce la fosforilación del dominio C-terminal de la RNA-polimerasa II, con la consecuente liberación del complejo SRB (figura 4-2). Lo que se propone es que la liberación del complejo SRB da la señal para la formación del complejo de preiniciación de la transcripción de manera estable. El siguiente paso está dictado por una masiva fosforilación de la región C-terminal, disociando al complejo de preiniciación y generando la transición en la cual la RNA-polimerasa II se involucra plenamente en el episodio de elongación; a su vez, se liberan los cofactores transcripcionales. Las señales que provocan la fosforilación del dominio C-terminal son aún desconocidas. Pero interacciones con los factores de transcripción, como TFIIB o TFIIH, pueden por una parte fomentar cambios conformacionales, pero también modular las fosforilación de la región C-terminal. Otras características interesantes de esta fosforilación consiste en que esta modificación postraduccional fluctúa extraordinariamente a lo largo del proceso de transcripción. La fosforilación esta dada por dos distintas CDK, siendo el C-terminal un sustrato propicio para CDK, de la familia de las serina-treonina-cinasas. De lo anterior, surge una observación interesante relacionada con las CDK. Dado que éstas representan un componente fundamental en la progresión del ciclo celular, sus actividades pudieran tener un papel maestro en la regulación transcripcional. A su vez, estas observaciones sugieren que pudiera existir un vínculo, más estrecho de lo que pudiera imaginarse, entre las moléculas reguladoras del ciclo celular y la maquinaria transcripcional.

La RNA-polimerasa II y TBP

A partir del aislamiento de TFIID y la posterior clonación y caracterización del DNAc de la proteína que se une a la caja TATA, denominada TBP por *TATA-box-binding protein,* se aislaron homólogos en múltiples organismos (Hernandez, 1993). Como en levadura, en *Drosophila* y en humano, TBP es una pequeña proteína de 38 kDa. Estudios funcionales han demostrado la capacidad de TBP, al igual que TFIID, de mediar una activación basal de la transcripción por la RNA-polimerasa II. Pero, a diferencia de TFIID, TBP no tiene la capacidad de respuesta a activadores transcripcionales (Pugh y Tjian, 1991). De la observación anterior surge la hipótesis que sugiere que, además de la función de TBP, se requiere de otros factores presentes en el

complejo TFIID, los cuales se conocen como coactivadores (Pugh y Tjian, 1991; Albright y Tjian, 2000). Análisis bioquímicos revelan que TFIID es un complejo multi-peptídico compuesto por TBP y un grupo de factores asociados, conocidos como TAF por *TBP-associated factors*. De lo anterior se deduce que las funciones de coactivadores están dadas por las diferentes TAF. Aparentemente, TBP como una subunidad de TFIID es exclusiva para genes transcritos por la RNA-polimerasa II. Lo anterior no es válido, dado que, para los tres tipos de polimerasas, existen sus excepciones. Una de las variantes más notorias es la de los promotores de genes que codifican para los pequeños RNA nucleares (*small nuclear RNA*) o snRNA, involucrados en el procesamiento de otras moléculas de RNA. La mayoría de estos genes se transcriben por medio de la RNA-polimerasa II, pero existen algunas excepciones, como el gen U6 snRNA que es transcrito por la RNA-polimerasa III. A partir de múltiples observaciones se ha podido concluir que TBP no es exclusivamente un factor transcripcional para la RNA-polimerasa II, de lo que se desprende que TBP puede estar involucrada en la transcripción mediada por los tres tipos de RNA-polimerasas (Hernandez, 1993). El requerimiento universal de TBP ha sido demostrado y confirmado en levadura, donde mutaciones en TBP tienen consecuencias en la transcripción mediada por las tres polimerasas (Cormack y Struhl, 1992). Por lo tanto, TBP es parte integral del complejo de iniciación para promotores de las tres RNA-polimerasas, incluyendo o no la caja TATA. Una de las hipótesis que surgen en relación con TBP es que su acción en los distintos promotores se lleva a cabo por vías alternas, aunque relacionadas, con la finalidad de reclutar de manera específica cada una de las polimerasas.

Como se mencionó anteriormente, el DNAc que codifica para la TBP ha sido clonado y caracterizado en un gran número de organismos. Un estudio comparativo de las diferentes secuencias de aminoácidos de TBP ha mostrado la presencia de un dominio amino-terminal (N-terminal) no conservado, mientras que el dominio C-terminal está altamente conservado, en el cual se localizan, de manera consistente, dos copias de una repetida, imperfecta, directa, de 61-62 aminoácidos. También, entre estas dos repetidas se localizan repetidas cortas, con residuos de aminoácidos básicos. La parte central del dominio C-terminal de la mayoría de las secuencias de TBP conocidas tiene más de 75% de identidad a nivel de sus secuencias peptídicas. Toda esta parte central constituye un amplio dominio de unión al DNA, el cual interactúa con éste en forma de un monómero, localizándose el contacto en el surco menor del DNA e induciendo una deformación del DNA alrededor de la secuencia TATA (Horikoshi y cols., 1990; Starr y Hawley, 1991; Hernandez, 1993).

La estructura de una de las TBP, la TBP-2 de *Arabidopsis thaliana,* ha sido cristalizada y determinada a una resolución de 2.6 Å (Nikolov y cols., 1992). La estructura tridimensional mostró que el dominio central posee una elegante simetría que forma, en el dominio de unión al DNA, una estructura de sillín, donde la simetría está proporcionada por las repetidas directas. Dada la gran similitud en secuencia, se espera que, a nivel estructural, exista una gran conservación entre las distintas TBP. Esta estructura en sillín es suficientemente amplia para pensar en, además de la unión al DNA,

interacciones proteína-proteína. Hay que recordar que TBP actúa en un contexto de múltiples interacciones con TFIID y sus TAF asociadas.

Los activadores y coactivadores

Los activadores y/o coactivadores desempeñan un papel muy importante en la regulación de la RNA-polimerasa II, dado que confieren una alta afinidad y especificidad hacia secuencias particulares de DNA en la región promotora. El centrarse en atraer a la polimerasa puede ser realizado a través de múltiples interacciones proteína-proteína, interacciones que involucran, principalmente, a los activadores. Por otra parte, TBP se encuentra asociada a numerosas proteínas. Junto con la polimerasa, se forma un complejo multipeptídico, en el cual, los activadores desempeñan un papel importante, ya que las interacciones proteína-proteína pueden inducir cambios conformacionales, lo que genera, a su vez, nuevas o diferentes interacciones. Por otra parte, y como veremos más adelante, los activadores tienen la capacidad de reclutar cofactores (tanto positivos como negativos), los cuales tienen efectos directos en la remodelación de la estructura de la cromatina, imprescindible para la activación transcripcional (Gamble y Freedman, 2002).

Los activadores y/o coactivadores desempeñan un papel muy importante en la regulación de la RNA-polimerasa II.

Las interacciones proteína-proteína, llevadas a cabo por los coactivadores y/o correpresores, son las que hacen que los activadores realicen sus funciones, funciones que incluso pueden ser a distancia, a través de la acción de elementos de regulación tipo estimuladores o silenciadores, el primero favoreciendo la actividad transcripcional y el segundo reprimiéndola. De lo anterior, se desprende una observación que nos lleva a considerar los diferentes niveles de regulación, dentro del proceso de inicio de la transcripción y, sobre todo, de su plasticidad y complejidad.

Existen activadores y coactivadores eucariontes con la capacidad de interactuar con miembros de la maquinaria basal de la transcripción, como TFIID (a través de las distintas TAF), TFIIB, TFIIF y TFIIH (Zawel y Reinberg, 1995; Triezenberg, 1995; Lemon y Tjian, 2000). Además de los activadores, se han definido a los coactivadores, como, por ejemplo, el cofactor positivo 4 o PC4, Dr2, entre otros, cuya función es la de modular de manera aún más fina la activación transcripcional (Zawel y Reinberg, 1995; Triezenberg, 1995; Lemon y Tjian, 2000). Es cuando se llevan a cabo interacciones entre activadores y coactivadores, que puede darse una remodelación de la estructura de la cromatina, la cual permitirá, subsecuentemente, la incorporación de la maquinaria basal de transcripción. Las TAF son moléculas que interactúan con coactivadores y se ha demostrado que estas interacciones contribuyen de manera importante a la activación. De esta forma, podemos imaginar que TFIID puede ser un centro con múltiples capacidades de respuesta a distintos tipos de señales, tanto extra como intracelulares, induciendo variabilidad en las formas de activación transcripcional y dando, por una parte, una mayor especificidad y, por otra, una rápida respuesta.

Existen activadores y coactivadores eucariontes con la capacidad de interactuar con miembros de la maquinaria basal de la transcripción.

En la actualidad, existen evidencias directas que señalan que la unión o contacto entre activadores y factores generales de transcripción, junto con

La unión o contacto entre activadores y factores generales de transcripción, junto con el remodelamiento de la estructura de la cromatina, son uno de los primeros episodios de activación transcripcional.

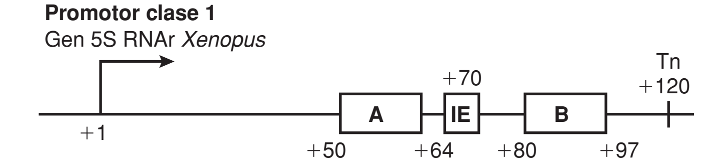
el remodelamiento de la estructura de la cromatina, son uno de los primeros episodios de activación transcripcional. Pero aquí surge una pregunta: ¿de qué forma estos contactos, generalmente proteína-proteína, pueden inducir un aumento en los niveles de transcripción, a partir de un promotor? A continuación, consideramos algunos de los mecanismos generales propuestos para explicar este tipo de activación. Una primera posibilidad es la que contempla que los activadores reclutan y concentran factores generales de transcripción directamente a la región promotora. Por ejemplo, se ha demostrado qué activadores pueden atraer a TFIID, TFIID/TFIIA y TFIIB a regiones promotoras (Goodrich y cols., 1996). A su vez, este mecanismo pudiera favorecer a promotores con secuencias alejadas de los consensos o, incluso, en ausencia de caja TATA. Una segunda posibilidad es que las interacciones entre activador y factor transcripcional general modifiquen la conformación ya existente, es decir, generen cambios en el complejo de preiniciación (Orphanides y Reinberg, 2002). Este tipo de cambios conformacionales puede traer como consecuencia la agrupación de nuevos factores, y así favorecer el inicio de la transcripción de manera diferencial. La tercera posibilidad es el efecto de los activadores y coactivadores en el reclutamiento de la maquinaria necesaria para remodelar la estructura de la cromatina, como por ejemplo, las acetilasas de histonas y los complejos de remodelaje ATP-dependientes (Orphanides y Reinberg, 2002; Narlikar y cols., 2002). En resumen, la acción de cofactores que afectan la activación transcripcional tanto de manera positiva como negativa se visualiza como un juego sutil de interacciones y reclutamiento de componentes adicionales que deben remover la estructura represora de la cromatina para que, en el punto culminante, la maquinaria basal de transcripción, con los factores generales de transcripción y la RNA-polimerasa, puedan tener acceso, de manera tiempo y tejido-específico, a su promotor y lograr así la activación y expresión de un gen.

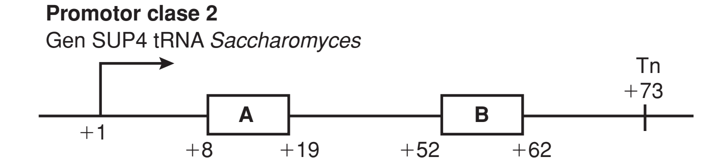
La RNA-polimerasa III

La tercera clase de RNA-polimerasa es la tipo III (Pol III) que transcribe los genes para los RNAs de transferencia (tRNA), al igual que el gen ribosomal 5S rRNA y algunos otros pequeños RNAs nucleares (snRNA).

Los promotores que son reconocidos por la RNA-polimerasa III se dividen en tres clases (Geiduschek y Kassavetis, 1992; Paule y White, 2000). La clase 1 y 2 son promotores sin caja TATA y tienen una región interna de control llamada ICR para el caso del gen ribosomal 5S rRNA, y las cajas A y B para RNA de transferencia, los genes 7SL y los genes virales tales como Ad2, VAI y VAII (figura 4-3). Por su parte, los promotores clase 3 han sido caracterizados en genes que codifican para pequeños RNA nucleares en vertebrados y en genes para RNA citoplasmáticos, entre los cuales se incluyen U6, 7Sk, hY1 y hY3, H1 y MRP/Th (Hernandez, 1993; Paule y White, 2000). La transcripción a partir de promotores con y sin caja TATA, por parte de la RNA-polimerasa III, requiere de TBP asociada a distintos complejos y no interactuando directamente con el DNA.

La tercera clase de RNA-polimerasa es la tipo III (Pol III) que transcribe los genes para los RNAs de transferencia (tRNA), al igual que el gen ribosomal 5S rRNA y algunos otros pequeños RNAs nucleares (snRNA).





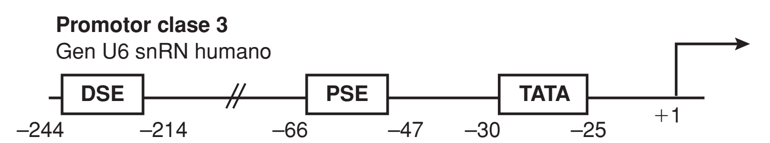


Figura 4-3. Esquema de las tres clases de promotores transcritos por la RNA-polimerasa III. En cada caso, el sitio de inicio de la transcripción se indica como +1, al igual que el sitio de terminación (Tn). IE: elemento intermedio; PSE: elemento de la secuencia proximal y DSE: elemento de la secuencia distal. De manera interesante para los promotores de la clase 1 y 2, se ha demostrado que TFIIC puede interactuar simultáneamente con las cajas A y B.

El principal elemento de regulación para genes transcritos por la RNA-polimerasa III se localiza dentro de la secuencia de DNA en que va a ser transcrito y se conoce como región interna de control o ICR. Este tipo de elemento se encuentra en promotores para genes de la clase 1 y 2. Para los genes clase 3, el elemento de regulación se encuentra "río arriba" del inicio de la transcripción. Dentro de esta región interna de control, existen las cajas A y B que son secuencias de unión a TFIIIA para los genes clase 1 y TFIIIC para los genes clase 2 (figura 4-3). La separación o distancia entre las cajas A y B, en los genes clase 1 y 2, es crítica y pequeñas variaciones en distancia afectan dramáticamente su actividad (Geiduschek y Kassavetis, 1992; Paule y White, 2000). Los promotores de genes clase 3, cuyos elementos de regulación se localizan arriba del sitio de inicio de la transcripción, tienen un interés particular. Este tipo de promotores tienen una doble función, dado que tienen elementos comunes a la RNA-polimerasa II y III. En este caso, el promotor está organizado en una secuencia similar a la caja TATA, un elemento proximal conocido como PSE, el cual se localiza a –56 pb, en relación con el inicio de la transcripción y un elemento distal, DSE, característico de los genes 7SK y U6 snRNA, en vertebrados (Geiduschek y Kassavetis, 1992; Paule y White, 2000).

> El principal elemento de regulación para genes transcritos por la RNA-polimerasa III se localiza dentro de la secuencia de DNA en que va a ser transcrito.



Los elementos de regulación

Los estimuladores y silenciadores

> Los estimuladores son considerados elementos de regulación que pueden fomentar los niveles de transcripción de un gen.

Los estimuladores son considerados elementos de regulación que pueden fomentar los niveles de transcripción de un gen, a partir de un promotor.

Por definición, se sabe que la acción de este tipo de elementos de regulación se da de manera independiente de su orientación y de su localización, es decir, en el costado 5' o 3', en relación al gen. Su acción puede darse a distancia, desde unos cuantos pares de bases, en el caso de la levadura, hasta 100 kb o más en *Drosophila* (Blackwood y Kadonaga, 1998; Bulger y Groudine, 1999). Los estimuladores pueden tener una especificidad diferencial; esto quiere decir que los estimuladores pueden ser tejido-específicos y activarse en etapas claves del desarrollo de un organismo. Su función está dada por las interacciones que se generan entre un fragmento de DNA y factores de transcripción específicos. Estos factores son los que pueden darle la marca particular a un estimulador, con base en interacciones tejido y tiempo-específicos, en combinación con factores generales o ubicuos. Con base en estas interacciones, se dice que un estimulador posee una organización modular donde cada módulo corresponde a una interacción única DNA-proteína (Recillas Targa y cols., 1993; Blackwood y Kadonaga, 1998). Un estimulador puede estar constituido por un módulo o varios módulos. El segundo caso, su distribución y combinatoria generan una respuesta reguladora altamente específica. Por otra parte, un elemento tipo estimulador difícilmente puede ser identificado con base en su secuencia nucleotídica.

Los silenciadores se definen de manera similar a los estimuladores, sólo que su efecto, en lugar de aumentar la actividad transcripcional, la disminuye.

Por su parte, los silenciadores se definen de manera similar a los estimuladores, sólo que su efecto, en lugar de aumentar la actividad transcripcional, el silenciador la disminuye. En la realidad, tampoco existen secuencias consenso que permitan definir un elemento tipo estimulador o silenciador. La identificación y caracterización de este tipo de elementos de regulación se hace mediante experimentos que revelan regiones abiertas en la cromatina, basados en el corte por parte de endonucleasas como la DNasa I (búsqueda de sitios de hipersensibilidad al corte, por parte de la DNasa I) o con base en ensayos funcionales donde se analiza, sea en células en cultivo o en animales transgenéticos, el aumento en la actividad transcripcional de un gen reportero (un gen cuya actividad transcripcional pueda ser cuantificada). De esta manera, generando fragmentos de DNA de diversos tamaños fusionados al gen reportero, es posible, con relativa facilidad, identificar en qué fragmento de DNA se observa una actividad reguladora que afecta los niveles de expresión del gen reportero. Cuando el elemento estimulador se localiza en regiones alejadas del gen al cual regula, entonces, la estrategia experimental, mediante la generación de fragmentos de DNA, no es la más práctica. Una alternativa experimental aconsejable, sobre todo para la búsqueda de este tipo de elementos en grandes zonas del genoma, es la identificación de sitios de corte en la doble cadena del DNA, por parte de la endonucleasa DNasa I. Esta enzima, como veremos más adelante, realiza un corte en la doble cadena, en particular en el surco mayor del DNA, siempre y cuando esa región se encuentre en una estructura de la cromatina suficientemente relajada y con una organización de los nucleosomas más laxa. El razonamiento teórico nos lleva a esperar que en las zonas con mayor acceso a la DNasa I, puedan llevarse a cabo la unión de factores proteicos a sus secuencias blanco en forma de módulos que, en combinatorias altamente específicas, van a conformar un estimulador o un silenciador. La

predicción teórica ha tenido gran éxito, dado que, mediante esta estrategia experimental, se han podido definir un gran número de elementos de regulación (Bulger y Groudine, 1999). Un ejemplo claro de lo anterior es el conjunto de sitios de hipersensibilidad a la DNasa I (HD), identificados en el grupo de genes de la globina en humano, los cuales se localizan entre 8 y 35 kb, "río arriba" del primer gen del dominio y que se denomina LCR, por *Locus Control Region,* que más adelante describiremos en detalle (Grosveld y cols., 1987; Bulger y Groudine, 1999).

A continuación, haremos una transición para analizar algunos aspectos estructurales de la cromatina, como son los nucleosomas y sus distintos niveles de estructuración, las secuencias tipo MAR o SAR, al igual que los elementos que delimitan o definen dominios cromosómicos. Esta parte intenta dar una visión estructural de la cromatina que será integrada en el contexto de la regulación transcripcional. Recordemos que tanto los promotores como los estimuladores o silenciadores se encuentran dentro del contexto de la estructura represora de la cromatina y que, para que estos elementos puedan ser funcionales, es necesario remodelar dicha estructura (Recillas-Targa y Razin, 2001).



Los nucleosomas

Los nucleosomas constituyen el primer nivel de compactación de la cromatina dentro del núcleo. Actualmente, se conoce la estructura nucleosomal que interactúa con el DNA a una resolución de 2.8 Å (Luger y cols., 1997). El nucleosoma se encuentra compuesto por un grupo de proteínas básicas llamadas histonas que se agrupan formando un octámero, el cual abarca alrededor de 146 pb de DNA. Las histonas se agrupan por pares (H3/H4 y H2A/H2B) (Arents y Moudrianakis, 1993; Wolffe, 1995; Luger y cols., 1997). Por otra parte, la histona H1 se une al DNA en la región internucleosomal, aunque también se ha sugerido su interacción con el nucleosoma, justo a la salida de la doble hebra del DNA. Se ha postulado que la histona H1, conocida también como H5, es la responsable de contribuir a la formación de niveles más elevados de compactación del genoma, empezando por la fibra de 30 nm o solenoide, la cual, por cierto, se sugiere que es el molde real donde se debe llevar a cabo la remodelación de la estructura de la cromatina para poder, posteriormente, iniciar la transcripción (Wolffe, 1993; Bulger y Groudine, 1999). Finalmente, es la formación de estas fibras lo que induce un mayor grado de compactación de la cromatina en el interior del núcleo.

> Los nucleosomas constituyen el primer nivel de compactación de la cromatina dentro del núcleo.

> El nucleosoma se encuentra compuesto por un grupo de proteínas básicas llamadas histonas que se agrupan formando un octámero, el cual abarca alrededor de 146 pares de bases de DNA.

La organización del octámero de histonas

Las cuatro histonas H3, H4, H2A y H2B poseen entre sí interacciones altamente selectivas. Cada una de estas histonas posee una región amino-terminal flexible que sobresale de la estructura global del octámero, mientras que la región carboxilo-terminal está involucrada en las interacciones entre

histonas en el interior del nucleosoma. La histona H2A forma un heterodímero con la histona H2B, mientras que la H3 forma un heterodímero con la histona H4. A nivel estructural, la interfase entre histonas y cada uno de los heterodímeros es muy similar, formando un motivo estructural compacto (Arents y cols., 1991; Luger y cols., 1997). Los dominios C-terminales de cada una de las histonas tienen una conformación peptídica tipo hélice α. Dichas hélices participan activamente en los contactos intermoleculares. Dos de las moléculas que conforman cada una de las cuatro histonas se encuentran presentes en cada nucleosoma, teniendo dichas histonas una organización tripartita, en donde el tetrámero central de histonas, el dímero H3/H4 y el dímero H2A/H2B, son estables únicamente en condiciones fisiológicas y particularmente en presencia del DNA.

Interacciones del DNA con el octámero de histonas

El análisis de la estructura de la cromatina mediante la utilización de nucleasas (enzimas que cortan el DNA) ha aportado información relacionada con la estructura y distribución de estas nucleoproteínas y sus interacciones con el DNA. En particular, han sido relevantes los resultados arrojados por la digestión de la cromatina por la nucleasa micrococal, lo que ha permitido definir el fragmento de DNA que abarca un nucleosoma; por lo tanto, permite determinar la posición de dicho nucleosoma, en función de una secuencia de DNA. Ésta fue de 146 pb de DNA, confirmado recientemente con la estructura a 2.8 Å, donde la molécula de DNA se enrolla al octámero de histonas, dando casi dos vueltas completas (Pruss y cols., 1995; Luger y cols., 1997). Molecularmente, se ha definido que la conformación del DNA alrededor del nucleosoma se modifica en particular, en relación con la torsión del DNA, sobre todo, si se compara con el DNA libre en solución (Hayes y cols., 1991a, b). Cuando el DNA se encuentra asociado al nucleosoma, la periodicidad de la doble hélice α es de 10.7 pb por vuelta, mientras que el DNA libre tiene una periodicidad de 10 pb por vuelta. Esta estructuración del DNA asociada al nucleosoma parece favorecer las interacciones con sitios específicos en el octámero de histonas y, a su vez, en ciertos casos exponer al DNA, en la cara externa del nucleosoma, secuencias de unión a factores de transcripción. Lo anterior está dado básicamente por los cambios de periodicidad en la helicoidicidad de 10.7 pb por vuelta del DNA (Arents y Moudrianakis, 1993). Por otra parte, cuando se realizan modificaciones en el octámero de histonas, en particular, cuando se elimina la región N-terminal de las histonas, no se presentan cambios importantes en la estructura del DNA (Hayes y cols., 1991a, b). A su vez, la interacción del DNA con los nucleosomas no es uniforme, es decir, que para una vuelta del DNA, alrededor del nucleosoma, existen diferentes ángulos y dobleces del DNA. Estas diferencias son las que van a servir para determinar zonas específicas de interacción entre el DNA y las histonas. Por otra parte, se ha demostrado claramente que el octámero de histonas ejerce un dominio estructural sobre el DNA (Hayes y cols., 1991a, b). Lo anterior sugiere que, para cualquier molécula de DNA, sin importar su estructura en

solución, se inducirá una misma modificación estructural, una vez que se asocie al octámero de histonas.

Estudios pioneros realizados por Mirzadekov y colaboradores demostraron mediante técnicas de entrecruzamiento (*crosslinking*), es decir, de congelamiento de las interacciones entre el DNA y las proteínas, que el DNA realiza sus contactos con el dominio C-terminal de las histonas (Ebralidse y cols., 1988; Luger y cols., 1997). De estos estudios se desprenden importantes observaciones relacionadas con la estructura nucleosomal y sus interacciones con el DNA. Por ejemplo, se ha demostrado que 30 pb de DNA interactúan directamente con la histona H4. El dominio N-terminal de la histona H4 es responsable de inducir una importante curvatura en el DNA (Ebralidse y cols., 1988). El dímero de histonas (H2A/H2B) interactúa con el DNA, siendo la histona H2A la única histona que tiene un dominio N y C-terminales básicos, donde el C-terminal es el que interactúa con el DNA. Finalmente, el tetrámero (H3/H4) interactúa con 120 pb de DNA (Dong y Van Holde, 1991; Luger y cols., 1997). Dentro de estas 120 pb de DNA, hay zonas de contacto con el extremo C-terminal de la H2A y con la histona H2B en un fragmento de 40-60 pb. La estabilidad de las interacciones del dímero de histonas (H2A/H2B) con el tetrámero (H3/H4) depende del mantenimiento de extensos contactos con el DNA. En resumen, la flexibilidad del dominio N-terminal, las múltiples interacciones entre cada histona y los contactos con el DNA sugieren que el conjunto forma una estructura altamente compacta.

Las histonas conectoras, los nucleosomas y las fibras cromatinianas

Los sitios de corte generados por la nucleasa micrococal en un DNA cubierto por nucleosomas en células somáticas mostraron la generación de fragmentos de 180-190 pb, en promedio. Este tamaño de fragmento se ha dado en llamar "repetidas nucleosomales". La caracterización de proteínas asociadas al DNA, en un complejo formado entre nucleosomas y DNA, durante la digestión de la cromatina mediante esta nucleasa reveló la presencia de un quinto tipo de histona. Esta nueva histona se conoce como la histona H1 o H5 y su presencia fue demostrada cuando, al reducir la distancia entre los nucleosomas, la histona H1 se perdía o se disociaba del DNA. Un análisis más detallado mostró que la histona H1, denominada también histona conectora, protege un fragmento adicional de DNA de 20 pb, contiguo al fragmento de 146 pb, que abarca el enrollamiento del nucleosoma.

La histona conectora posee tres dominios estructurales: los extremos N y C-terminales se encuentran flanqueados por un dominio globular central. Se ha demostrado que la región globular de la histona H1 es la que contacta al DNA (Allan y cols., 1980). Se ha propuesto un modelo que trata de explicar la funcionalidad del dominio globular de la histona H1, con base en su localización entre dos nucleosomas, dado que cada una de las cadenas del DNA, provenientes de la entrada y la salida del nucleosoma tienen contacto con la histona H1. El tercer contacto se realiza directamente con

el surco menor del DNA orientado en el sentido opuesto, en relación con el nucleosoma (Allan y cols., 1980).

La estructura del dominio globular de la histona conectora H5 (GH5) ha sido determinada (Ramakrishnan y cols., 1993). Esta estructura mostró una importante similitud entre la histona H5 y el dominio de unión al DNA del factor transcripcional HNF-3 (Clark y cols., 1993). HNF-3 tiene afinidad para unirse al surco mayor del DNA en forma de un monómero, induciendo un doblez hacia sí mismo. Los aminoácidos clave para el reconocimiento del DNA por parte del factor transcripcional HNF-3 están totalmente conservados entre HNF-3 y la histona H5, lo cual sugiere fuertemente que el dominio globular de H5 contacta al DNA del nucleosoma de una forma similar. Lo anterior coincide con el hecho de que el residuo histidina 25 de la histona H5 es la que contacta el DNA del nucleosoma (Mirkovitch y cols., 1984). Por el momento, no se sabe si es una histona H1 o si se forma un dímero de H1, el cual se une al DNA. Existe la posibilidad de tener más interacciones de las histonas conectoras con otras histonas conectoras del nucleosoma adyacente, lo que hace proponer la hipótesis de que con base en las histonas conectoras podemos esperar un arreglo de los nucleosomas que induce un alto grado de organización de las fibras cromatinianas.

La acetilación y desacetilación de las histonas: el código de histonas

Las estructuras relacionadas con la cromatina, al igual que la estabilidad de estas mismas, determinan aparentemente cuándo y en qué lugar los nucleosomas pueden realizar su función represora o, por otro lado, tener una función indirecta de activador transcripcional (Schild y cols., 1993).

Mutaciones en forma individual de las histonas generan modificaciones importantes en la organización de la cromatina en el núcleo de una célula eucarionte, teniendo como consecuencia directa cambios, de manera selectiva, de la expresión de los genes. La mencionada selectividad depende de la formación de complejos multiproteicos que modulan la cromatina y dan las señales de especificidad (Lemon y Tjian, 2000). De lo anterior se ha propuesto que las modificaciones de las histonas y, por lo tanto, de los nucleosomas, constituyen episodios dinámicos.

La manera de entender dicha dinámica es a través de las modificaciones postraduccionales que sufren las regiones amino-terminales de las histonas. Los residuos que componen estas regiones resultan ser el blanco de modificaciones postraduccionales tales como la acetilación, la metilación, la fosforilación, entre otras (Wolffe, 1995). En particular, la acetilación de los residuos lisina en las regiones amino-terminales de las histonas contribuye a neutralizar la carga neta de las histonas, favoreciendo un relajamiento de la estructura nucleosomal y, por lo tanto, en la interacción con el DNA. Esto trae como consecuencia una estructura de la cromatina más relajada que favorece la actividad transcripcional. Por el contrario, la desacetilación de las histonas genera una estructura de la cromatina compacta

> La acetilación de los residuos lisina en las regiones amino-terminales de las histonas contribuye a neutralizar la carga neta de las histonas, que favorece la actividad transcripcional.

y, por lo tanto, represora para la actividad transcripcional. Este tipo de modificaciones está dirigido por dos familias de enzimas, las acetil-transferasas de histonas, conocidas como HAT (*histone acetyl-transferases*) y por las desacetil-transferasas de histonas o HDAC (*histone deacetyl-transferases*), respectivamente. Cabe señalar en este contexto la relevancia que tienen los activadores y cofactores en la remodelación de la estructura de la cromatina, dado que, a pesar de no tener la capacidad de modificar la estructura de la cromatina, son los responsables de manera específica de reclutar a las HAT o HDAC a regiones de control, como los promotores, y favorecer o reprimir la activación transcripcional (Lemon y Tjian, 2000).

En resumen, las características moleculares de la acetilación y desacetilación de las histonas son una muestra de cómo la estructura de la cromatina y su relación con la regulación de la expresión genética es un proceso dinámico.

La acetilación y desacetilación de las histonas son una muestra de cómo la estructura de la cromatina y su relación con la regulación de la expresión genética es un proceso dinámico.

En la actualidad, podemos esperar que otro tipo de enzimas puedan tener la capacidad de modificar directa o indirectamente la estructura de la cromatina. En efecto, recientemente los grupos de Allis y Jenuwein demostraron que la metilación diferencial de la histona H3 trae consecuencias tanto positivas como negativas, en cuanto a la estructura de la cromatina, en ciertos promotores (Rea y cols., 2000). En particular, la metilación de la lisina 4 de la región amino-terminal de la histona H3 se ve asociada con la activación transcripcional (Rea y cols., 2000). Por el contrario, el descubrimiento de la proteína SUV39H1 en humano y Suv39h1 en ratón, con una actividad de metil-transferasa específica para la lisina 9, de la región amino-terminal de la histona H3, trajo consigo la demostración de que dicha modificación postraduccional provoca el reclutamiento de la *heterochromatin protein* 1, conocida como HP1 (Rea y cols., 2000). Este episodio tiene como consecuencia que la modificación postraduccional de la histona H3 por la metilación de la lisina 9 provoque la formación de una estructura tipo heterocromatina, que se sabe es altamente compacta e inaccesible a la maquinaria transcripcional. Un ejemplo de lo anterior está dado en el promotor de la ciclina E, donde se ha demostrado que la unión del factor E2, el cual interactúa con la proteína de retinoblastoma, puede a su vez reclutar a SUV39H, es decir, a metil-transferasa de histonas, y metilar la lisina 9 de la región amino-terminal de la histona H3, permitiendo así la formación de heterocromatina a través de la interacción de HP1 en dicho promotor (Nielsen y cols., 2001).

En resumen, éstos son algunos ejemplos de las modificaciones que sufren las histonas, las cuales ponen en evidencia la comunicación entre proteínas que constituyen la arquitectura de la cromatina, como son las histonas y sus modificaciones postraduccionales, y moléculas reguladoras del ciclo celular, y son componentes esenciales de la vida del núcleo de una célula eucarionte. Con base en lo anterior y en el gran número de combinatorias en cuanto a dichas modificaciones, Allis propuso que las regiones amino-terminales de las histonas son el blanco de un código de histonas que genera una gran plasticidad de respuesta a nivel de la estructura de la cromatina, con consecuencias directas en diversos procesos nucleares (Strahl y Allis, 2000).

Complejos de remodelaje ATP-dependiente

Una alternativa dentro de la regulación epigenética es la acción de los complejos de remodelaje dependientes de ATP y cuya función es la de desplazar, reorganizar, desorganizar y deslizar a los nucleosomas (Narlikar y cols., 2002). Como consecuencia de dicha actividad, es posible el acceso a sus secuencias blanco para una gama importante de factores de transcripción, que incluso comprende al complejo mínimo de preiniciación de la transcripción (Narlikar y cols., 2002). Estos complejos poseen varias subunidades que incluyen, en algunos casos, 16 componentes, entre los cuales destaca la subunidad con actividad de ATPasa. Actualmente, datos experimentales muestran que este tipo de complejos puede actuar sinérgicamente con otras modificaciones como la acetilación y desacetilación de histonas, y que su función tiene un orden secuencial específico. Una vez más nos encontramos ante un ejemplo donde, sin que ocurran mutaciones en la secuencia de DNA, se presente una regulación de tipo epigenético que va a favorecer o inhibir la actividad transcripcional.

Evidencias experimentales recientes sugieren que algunas subunidades de estos complejos de remodelaje pueden actuar como supresores tumorales. También pueden participar activando o reprimiendo ciertos oncogenes y/o genes supresores de tumores (Klochendler-Yeivin y cols., 2002). Por lo tanto, estos complejos en su origen asociados exclusivamente a la función de remodelaje de la cromatina también se relacionan con procesos tumorales.

La metilación del DNA

La metilación del DNA consiste en la incorporación de un grupo metilo en la posición 5 de la citosina, en el dinucleótido CpG.

La metilación del DNA consiste en la incorporación de un grupo metilo en la posición 5 de la citosina, en el dinucleótido CpG. Actualmente, se conocen tres enzimas responsables de la metilación del DNA: la Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b. Estas enzimas son esenciales para la vida celular y son responsables tanto de la metilación conocida como *de novo*, como de la de mantenimiento (Bestor, 2000; Bird, 2002).

La modificación epigenética a través de la metilación tiene que ver con represión o silenciamiento de la expresión genética. Como se mencionó anteriormente, la interferencia es uno de los modelos que explican cómo un DNA metilado puede regular negativamente la expresión de un gen. Ésta es la visión más sencilla y consiste simplemente en la incapacidad por parte de un factor transcripcional, usualmente crítico, para la expresión de un gen, para unirse al DNA en su secuencia de reconocimiento, dado que el o los grupos metilo localizados en los dinucleótidos CpG impiden directamente dicha unión. Un ejemplo típico es la incapacidad del factor CTCF para unirse a sus secuencias blanco en el alelo paterno de la región diferencial de metilación del *locus Igf2/H19*, mientras que, en el alelo materno CTCF puede unirse, dado que sus secuencias de reconocimiento en el DNA, ricas en CpG, no se encuentran metiladas (West y cols., 2002).

El segundo modelo es más complejo y participan en él un grupo de proteínas llamadas MeCP con la particularidad de poder unirse al DNA metilado.

Lo anterior implica que no requieren secuencias específicas de unión al DNA, como los factores de transcripción. La unión de estas proteínas al DNA metilado trae consigo la interacción secuencial de otras proteínas, básicamente por contactos proteína-proteína (Bird, 2002). Uno de los factores relevantes es el correpresor mSin3, el cual, a su vez, mediante otras interacciones, tiene la capacidad de reclutar a desacetilasas de histonas (HDAC). Toda esta serie secuencial de interacciones tiene como objetivo final el inducir una estructura de la cromatina altamente compacta y, por lo tanto, refractaria para la activación transcripcional.

Actualmente existen distintas estrategias metodológicas a nivel molecular para el estudio de la metilación del DNA. La más común es mediante el uso de enzimas de restricción que reconocen a la secuencia CCGG sensibles e insensibles a la metilación, como lo son Hap II y Msp I. Una alternativa más sensible y que permite definir qué dinucleótidos CpG se encuentran metilados, es mediante el tratamiento del DNA genómico con bisulfito de sodio, la amplificación por PCR del DNA genómico modificado y la subsecuente secuenciación del DNA para determinar a nivel de un solo nucleótido qué bases se encuentran metiladas (Singal y Ginder, 1999). Para determinar la interacción de las proteínas MeCP, se utiliza la inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpos que reconocen estas proteínas. Brevemente, la interacción entre estas proteínas y el DNA metilado puede ser congelada mediante el uso de formaldehído para, posteriormente, inmunoprecipitar con anticuerpos específicos, y el DNA de la fracción inmunoprecipitada se purifica para ser amplificada por PCR (Magdinier y Wolffe, 2001). Finalmente, el estado de metilación puede ser revertido mediante el uso de inhibidores de la metilación como la 5-azacitidina o la 5-azadicitidina, las cuales son análogas de la citidina que, al incorporarse al DNA posduplicado, no pueden ser metilados por las metiltransferasas de histonas.



Elementos de organización y topología de la cromatina

Actualmente se ha acumulado una serie importante de evidencias que indican que distintas regiones de la cromatina poseen propiedades diferentes y que dichas propiedades, igual que los elementos de regulación, aunque a nivel previo, tienen una influencia muy importante en la expresión diferencial de los genes. Dichas evidencias sugieren, a su vez, que la cromatina se encuentra estructural y funcionalmente organizada en dominios (Vázquez y cols., 1993; Recillas Targa y Razin, 2001). Una de las preguntas con mayor actualidad en esta área de estudio es: ¿qué define un dominio cromatiniano transcripcionalmente activo? A continuación describiremos algunos de los elementos estructurales que desempeñan un papel en la formación de dominios cromatinianos, con efecto directo sobre la regulación de la expresión genética. De manera general, podemos citar cuatro tipos de elementos estructurales y funcionales de la cromatina con la capacidad de definir un dominio: i) los sitios de hipersensibilidad a la DNasa I; ii) los elementos ti-

po LCR (*locus control region*) compuestos por uno o más sitios de hipersensibilidad; iii) las secuencias tipo MAR/SAR que tienen la capacidad de unirse a la matriz nuclear; y iv) los delimitadores o *insulators* que contribuyen a definir y mantener un dominio.

Los sitios de hipersensibilidad

Las regiones en el DNA donde la estructura de la cromatina permite el acceso a la acción de la endonucleasa DNasa I se definen como sitios de hipersensibilidad a la DNasa I.

Las regiones en el DNA donde la estructura de la cromatina permite el acceso a la acción de la endonucleasa DNasa I se definen como sitios de hipersensibilidad a la DNasa I. Por lo general, estas regiones abarcan, de manera local, fragmentos de DNA de 200 a 600 pb, donde el DNA se encuentra en una estructura laxa de la cromatina, con incluso una menor densidad de nucleosomas. Consecuentemente, estas regiones son accesibles a los factores de transcripción y, por ello, pueden unirse a sus secuencias blanco en el DNA. Como podemos imaginar, las interacciones DNA-proteína no serían posibles si la cromatina se encontrara constitutivamente en un alto grado de compactación. Es por esta razón que el acceso físico y su consecuente función de corte sobre la doble cadena del DNA por parte de la DNasa I permite definir regiones "abiertas" en la cromatina. Con base en estas características, sabemos que los elementos de regulación tales como promotores, silenciadores, LCR y delimitadores (*insulators*) están localizados en fragmentos de DNA hipersensibles al corte por parte de la DNasa I. También se ha visto que, en regiones donde se lleva a cabo la duplicación del DNA, se han identificado sitios de hipersensibilidad. El común denominador en todos los casos anteriores es la presencia en el DNA de sitios de unión a factores peptídicos, necesarios para las funciones de regulación de la expresión de los genes. Existen distintos tipos de sitios de hipersensibilidad, como los sitios tejido-específico, linaje celular-dependientes, los específicos a una etapa del desarrollo o los sitios de hipersensibilidad constitutivos. De lo anterior podemos deducir que la búsqueda e identificación de sitios de hipersensibilidad a la DNasa I es una estrategia experimental atractiva que nos permite localizar, en grandes extensiones de DNA, elementos de regulación de todo tipo. Recientemente, Boyes y Felsenfeld han definido, para el caso del sitio de hipersensibilidad que se localiza en el estimulador β/ε de los genes β-globina de pollo, que la formación del sitio de hipersensibilidad es dependiente de la acción de los factores eritroide-específicos, sumándose posteriormente la acción de factores de transcripción generales (Boyes y Felsenfeld, 1996). Ésta es la primera demostración en la cual aparentemente son los factores de transcripción específicos y los generales los que generan un sitio de hipersensibilidad. Lo anterior no nos explica aún cuál es el mecanismo por el cual se forma un sitio de hipersensibilidad. Una posibilidad es mediante la acetilación de histonas y/o la acción de complejos de remodelaje ATP-dependientes, como SWI/SNF o NURF (Boyes y Felsenfeld, 1996; Narlikar y cols., 2002). Por otra parte, Felsenfeld ha cuantificado la formación de estos sitios mediante digestiones con enzimas de restricción localizadas en el propio sitio de hipersensibilidad. Como podemos imaginar, mientras más compactada esté la estructura de la cromatina menos acceso

tendrá la enzima de restricción para cortar en sus secuencias de reconocimiento, lo que refleja directamente el grado de formación del sitio de hipersensibilidad y, en consecuencia, el grado de apertura a la cromatina. Finalmente, se ha propuesto un modelo en el cual la formación de los sitios de hipersensibilidad es un episodio estocástico, en el cual mutaciones que reducen el número de uniones de factores de transcripción, primero tejido-específico y después generales, reducen la probabilidad de que estos mismos factores prevalezcan sobre la interacción de los nucleosomas y, de esta forma, mantengan esa región de la cromatina "abierta".

Las secuencias tipo MAR/SAR

Las secuencias MAR/SAR se definen como secuencias genómicas que tienen la capacidad de unirse preferencialmente a la matriz nuclear, después de haber extraído el DNA genómico.

Estas secuencias de DNA se definen como secuencias genómicas que tienen la capacidad de unirse preferencialmente a la matriz nuclear, después de haber extraído el DNA genómico con alta sal, 5M NaCl o con el detergente diyodosalicilato de litio (Mirkovitch y cols., 1984; Farache y cols., 1990). El término MAR y SAR es equivalente, y se refieren a: *matrix attachment regions* y *scaffold-associated regions*, respectivamente. El DNA así extraído es posteriormente digerido con la endonucleasa DNasa I con la idea de eliminar todo el DNA genómico que no se encuentra protegido por la interacción con la matriz nuclear. Un tratamiento con proteinasa K y RNasa completa la extracción, y la fracción de genoma, así recuperado, será el que se encontraba asociado a la matriz nuclear (Cockerill y Garrard, 1986; Laemmli y cols., 1992; Hart y Laemmli, 1998). Actualmente se ha podido definir la secuencia nucleotídica de fragmentos de DNA, interactuando con la matriz nuclear en múltiples organismos (Cockerill y Garrard, 1986; Hart y Laemmli, 1998). De manera general, estas secuencias tipo MAR son secuencias de DNA, al menos 70% ricas en A + T. Una característica es la ausencia de una secuencia consenso identificable por un estudio en las bases de datos por computadora. Las secuencias MAR están probablemente dadas por una estructuración particular del DNA, favorecida por su abundancia en nucleótidos A + T (Laemmli y cols., 1992; Hart y Laemmli, 1998). Boulikas, por su parte, analizando las secuencias nucleótidicas de MAR conocidas, identificó en repetidas ocasiones los motivos ATTA y ATTTA, los cuales pudieran ayudar de manera cooperativa a las funciones de interacción con la matriz nuclear, además de que estas secuencias se han identificado también en orígenes de duplicación (Boulikas, 1992, 1993). Entre los motivos que se han identificado en estas secuencias MAR se encuentra el consenso para la unión de la topoisomerasa II. La presencia de la secuencia de reconocimiento a la topoisomerasa II es otra de las características de las secuencias tipo MAR (Cockerill y Garrard, 1986; Laemmli y cols., 1992). Por otra parte, la importancia de las repetidas A + T se ha confirmado experimentalmente utilizando la distamicina, una droga citotóxica que se une con alta afinidad a los trechos de adeninas, en particular en las secuencias tipo MAR (Laemmli y cols., 1992). La titulación selectiva de los trechos de adeninas en las secuencias tipo MAR, empleando distamicina, impide las interacciones entre las MAR, las proteínas que se unen a las secuencias MAR y a la matriz nu-

clear. Dos de las proteínas que se unen a las secuencias MAR son la topoisomerasa II y la proteína ARBP (*attachment region-binding protein*) de 110 kDa (Von Kries y cols., 1991). Se ha propuesto que estas proteínas colaboran en la topología de la cromatina que se deriva de la interacción con las secuencias tipo MAR. En particular, una vez que se da la estructuración de la cromatina, en asas o *loops*, se genera una alta tensión provocada por la torsión de la doble hélice α de la cadena del DNA. Consecuentemente, esta torsión debe ser aliviada por la acción de la topoisomerasa II, la cual hace un corte proteolítico y libera la superhelicoidicidad (o torsión) del DNA, permitiendo una estructuración topológica favorable, mediada en parte por las secuencias MAR y sus interacciones con la matriz nuclear. Con estos antecedentes, se ha propuesto que la conformación topológica favorable de la cromatina, a la cual nos referimos anteriormente, no es nada más que la formación de asas o *loops* cromatinianos. Se ha propuesto que la formación de estas asas cromatinianas ocurre en la base de ellas, en donde se localizan las interacciones entre las secuencias MAR y la matriz nuclear. Funcionalmente, se han propuesto al menos dos propiedades para estas asas. La primera es la de definir dominios genéticos y/o dominios estructurales en la cromatina. En cuanto a la segunda, estos dominios favorecen topológicamente las interacciones a distancia (como veremos más adelante), de modo que descompacta la estructura de la cromatina, facilitando el acceso a factores de transcripción y, en suma, todo lo anterior repercute en un dominio funcionalmente activo donde se favorece la expresión diferencial de un gen o un grupo de genes.

Ahora bien, la pregunta es: ¿ejercen las secuencias tipo MAR una influencia sobre la expresión genética? Secuencias MAR que flanquean un gen reportero tanto homólogo como heterólogo pueden estimular la actividad transcripcional por un factor que va de 10 a 20 veces (Laemmli y cols., 1992; Phi-Van y Stratling, 1996; Bonifer, 2000). Cabe señalar que este tipo de observaciones sólo se dan cuando el vector reportero se encuentra integrado al genoma. Esto difiere de un ensayo para estudiar la funcionalidad de un elemento estimulador. Por otra parte, resulta interesante señalar que en la mayoría de las regiones dentro de la cromatina donde se localizan secuencias MAR, se colocalizan tanto elementos estructurales como de regulación. Un ejemplo de lo anterior es el grupo de gen α-globina de pollo donde, colocalizando secuencias MAR, se encuentran sitios de hipersensibilidad a la DNasa I y la nucleasa S1, como un elemento estimulador, sitios de corte a la topoisomerasa II, entre otros (Farache y cols., 1990; Recillas Targa y cols., 1995). De lo anterior podemos concluir que las regiones intergenéticas son un candidato indiscutible a ser tomadas en cuenta seriamente, con base en la gran cantidad de elementos tanto estructurales de la cromatina como de regulación.

Los LCR se definen como un elemento de regulación formado por un sitio o un grupo de sitios de hipersensibilidad a la DNasa I.

Los elementos LCR

Los LCR se definen como un elemento de regulación formado por un sitio o un grupo de sitios de hipersensibilidad a la DNasa I, cuya función es ne-

cesaria para la expresión regulada de un gen o grupo de genes (Bulger y Groudine, 1999). Originalmente el LCR fue definido en el dominio genético que agrupa a los genes de la globina humana; además, en la actualidad se han definido otros LCR (Bonifer, 2000). Para el grupo de genes β-globina de humano se han definido 7 sitios de hipersensibilidad a la DNasa I (Bulger y Groudine, 1999). Ensayos funcionales, tanto en células en cultivo como en animales transgenéticos, demostraron la capacidad del LCR para dirigir la expresión de un gen reportero, integrado al genoma, de manera dependiente del número de copias e independiente del sitio de integración (Grosveld y cols., 1987). Lo anterior permite proponer dos funciones principales para los LCR: 1) la de fomentar la actividad transcripcional de manera similar a los estimuladores, y 2) la de contribuir a la apertura de la estructura de la cromatina a nivel del dominio (Bulger y Groudine, 1999). Un gran número de laboratorios se dedican al estudio de los mecanismos de acción de los LCR. De estos estudios se han derivado cuatro modelos: 1) el modelo de *looping* o formación de una asa que fomenta la interacción específica en tiempo y en espacio de los factores asociados al LCR con los de cada uno de los promotores, 2) el modelo de *tracking* o encarrilamiento propone que la maquinaria transcripcional se concentra en el LCR y, a través del DNA, tiene acceso a los promotores por medio de interacciones específicas, 3) el modelo de los transcritos intergenéticos. Este modelo se basa en la demostración de que en las regiones intergenéticas del grupo de genes β-globina humano existen transcritos (RNA) que no codifican para ningún producto, pero que su presencia se asocia a una apertura específica de la cromatina en el dominio, favoreciendo la regulación del mismo; y finalmente, 4) el modelo de *linking* o de relevo. Este modelo se basa en datos genéticos obtenidos en *Drosophila* y propone que las interacciones a distancia entre el LCR y los promotores se ve facilitada por interacciones proteína-proteína, generando un relevo en las señales (Bulger y Groudine, 1999). Resulta evidente que el estudio básico de este tipo de elementos estructurales y funcionales de la cromatina aportan conocimiento sobre la organización y regulación del genoma.

Dominios y delimitadores (*insulators*)

Otros de los elementos que pueden ser considerados como posibles entidades cromatinianas que definen los límites de un dominio son las secuencias delimitadoras o *insulators* (West y cols., 2002). Estas secuencias fueron por primera vez definidas por Kellum y Schedl en 1991. Estos investigadores mostraron que delimitando al *locus* del gen *hsp70* de *Drosophila melanogaster* se encuentran dos secuencias de DNA hipersensibles a la DNasa I y que se les denominó *scs* y *scs'* por *specialized chromatin structures*, las cuales protegen al *locus* hsp70 del medio local de la cromatina (Kellum y Schedl, 1991; 1992). De manera teórica, se propone a los *insulators* como elementos estructurales de la cromatina que favorecen la formación y mantenimiento de manera regulada de un dominio transcripcionalmente activo (West y cols., 2002). A nivel funcional, los *insulators* se definen mediante

Los *insulators* son elementos estructurales de la cromatina que favorecen la formación y mantenimiento de manera regulada de un dominio transcripcionalmente activo.

dos propiedades, aunque no todos los *insulators* poseen ambas. La primera propiedad consiste en la capacidad de estas secuencias de DNA y sus factores asociados para bloquear la acción de un *estimulador* sobre su promotor, únicamente cuando la secuencia *insulator* se localice entre el estimulador y el promotor (Wolffe, 1994; Gerasimova y Corces, 1996; Bell y cols., 1999; Recillas Targa y cols., 1999). La segunda propiedad tiene que ver con la capacidad por parte del *insulator* para proteger a un transgenético del efecto de posición que causan los distintos medios de la cromatina en el interior del núcleo. Lo anterior trae como consecuencia una expresión más homogénea y sostenida a lo largo del tiempo por parte de un transgenético, siempre y cuando éste se encuentre enmarcado por secuencias tipo *insulator* (Pikaart y cols., 1998; Recillas Targa y cols., 2002).

El *insulator* mejor caracterizado es el que se encuentra en el límite 5' del grupo de genes β-globina de pollo (figura 4-4). Originalmente definido como un sitio constitutivo de hipersensibilidad, se ha demostrado que representa un sitio de clara transición entre un dominio donde la cromatina se encuentra abierta (el dominio β-globina) y una región altamente compacta (Cheng y cols., 1993; Recillas Targa, 2000; West y cols., 2002). El grupo de Felsenfeld ha demostrado que un fragmento de 1.2 kb que comprende a dicho sitio de hipersensibilidad posee las dos propiedades que caracterizan a los *insulators*, es decir, tiene la capacidad de bloquear a un *estimulador* sobre su promotor, tanto en transfecciones estables como transitorias (Bell y cols., 1999; Recillas Targa y cols., 1999). Por otra parte, es

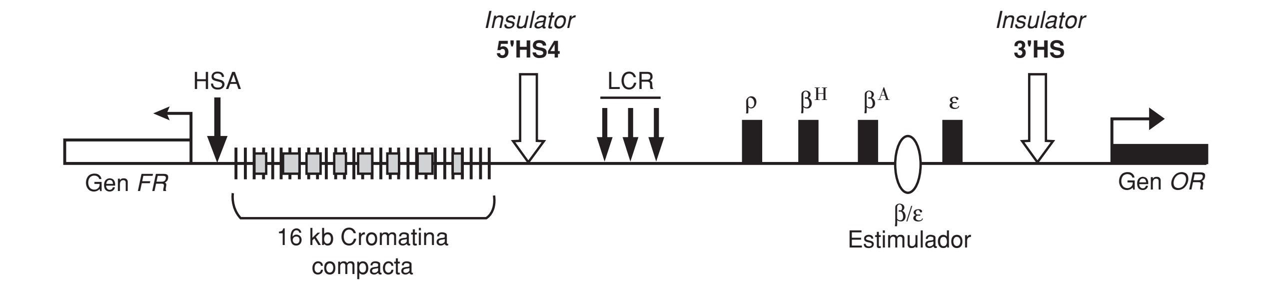


Figura 4-4. Esquema del dominio *β*-globina de pollo. Los límites de este dominio eritroide-específico son definidos por dos elementos tipo *insulator*. De manera interesante, a cada uno de los *insulators* se le asocia el factor nuclear CTCF, lo cual genera una posible especulación en términos de una interacción física y formación de un asa cromatiniana entre los extremos del dominio β-globina de pollo (West y cols., Recillas Targa y cols., 2002). El dominio β-globina está compuesto por un gen que se expresa en la etapa fetal (ρ), dos genes adultos (β^H y β^A) y un gen embrionario (ε) que se transcriben diferencialmente a lo largo del desarrollo (Recillas Targa, 2000). "Río arriba" en relación con el límite 5' del dominio, se identificaron 16 kb de cromatina condensada, altamente metilada e inaccesible al corte por parte de la DNasa I (Prioleau y cols., 1999). Posteriormente se encontró un gen que codifica para un receptor de folato (*FR*) con un patrón de expresión eritroide, pero curiosamente en una etapa de diferenciación eritroide previa a los genes β-globina. Por su parte, "río abajo" en relación con el extremo 3' del dominio, se identificó uno de los genes que codifican para un receptor olfatorio (*OR*) con un aparente patrón de expresión restringido al cerebro (Saitoh y cols., 2000).

capaz de proteger a diversos genes reporteros del efecto de posición en distintos organismos y en líneas celulares (Pikaart y cols., 1998; West y cols., 2002; Recillas Targa y cols., 2002). Estudios más detallados permitieron definir los dominios aledaños al grupo de genes β-globina de pollo. En el costado 5' se identificó una región de 16 kb de cromatina condensada y, "río arriba", un gen que codifica para uno de los receptores del folato (figura 4-4; Prioleau y cols., 1999). De manera interesante, el gen de receptor de folato es eritroide-específico y se expresa en una etapa previa de diferenciación de los genes β-globina (Prioleau y cols., 1999). En el costado 3', en relación con el dominio β-globina, se identificó otro sitio constitutivo de hipersensibilidad (Saitoh y cols., 2000). "Río abajo" se identificó al siguiente dominio constituido por un gen que codifica para un receptor olfatorio con un programa de expresión específico de cerebro. De manera inesperada, el sitio constitutivo de hipersensibilidad resultó ser un *insulator* con sólo una de las propiedades: la de bloqueo de *estimulador* (Saitoh y cols., 2000; Recillas Targa y cols., 2002). Un punto adicional es que la actividad de bloqueo de *estimulador* es dependiente del factor nuclear CTCF, el cual se encuentra *in vivo* en ambos límites del dominio β-globina de pollo (Recillas Targa y cols., 2002). Todas estas características representan el primer ejemplo de la organización del genoma en dominios (West y cols., 2002). En resumen, para el grupo de gen β-globina de pollo se encuentran claramente delimitados en un dominio definido por *insulators*, lo cual valida parcialmente las ideas propuestas en relación con su función. Claro está que faltan más experimentos *in vivo* que confirmen la actividad de los *insulators* en la formación y mantenimiento de un dominio. Finalmente, resulta difícil pensar que todos los dominios o todos los genes necesiten de elementos tipo *insulator* para su expresión. Es probable que existan regiones en el genoma que por su distribución y características propias no necesiten ser tan claramente delimitadas. Desde un punto de vista aplicado, los *insulators* y su actividad de protección contra el efecto de posición parecen ser una posibilidad real para su uso en vectores diseñados para terapia genética (Recillas Targa, 2000; Recillas Targa y cols., 2002; West y cols., 2002).



El núcleo y la expresión genética

Territorios

Hace algún tiempo se pensaba en el núcleo como una estructura en donde la transcripción, la replicación y todas las actividades de procesamiento del RNA, se llevaban a cabo en cualquier lugar de éste. Actualmente se tiene otra concepción. Se sabe que el núcleo tiene una estructura tridimensional y que esta estructura se adapta a distintas circunstancias, como por ejemplo, en respuesta a diferentes tipos de estrés o durante las distintas etapas del ciclo celular para facilitar las funciones celulares, nucleares y de segregación.

En un núcleo en interfase, los cromosomas están organizados en zonas/regiones llamados territorios cromosomales, los cuales, basados en mode-

los propuestos por varios grupos, sugieren que se encuentran separados por canales llamados dominios intercromosomales. En esta etapa del ciclo celular, los cromosomas son altamente dinámicos y se ha visto que los genes activos transcripcionalmente se encuentran más cerca de los canales intercromosomales aledaños a la superficie de los territorios y con una mayor superficie de contacto con éstos. Se ha comprobado que los cromosomas se mueven dentro de su territorio y se ha propuesto que la explicación a este movimiento está determinada por la abundancia de factores involucrados en el procesamiento, la transcripción y la replicación en focos localizados aledaños a estos territorios. Para explicar este concepto, existe un ejemplo clásico que demuestra el movimiento o reclutamiento de genes a una región en las células B de ratón que es rica en una proteína llamada Ikaros. Esta proteína es capaz de inactivar a los genes a través de su relocalización a una región centromérica de heterocromatina. Mientras que los genes que necesitan ser transcritos permanecen en zonas favorables del nucleoplasma, Ikaros recluta a los genes que deben ser reprimidos a sitios de heterocromatina para inactivarlos (Lamond y Earnshaw, 1998). Esta represión involucra el movimiento de *loci* específicos a un compartimiento nuclear donde son silenciados activamente.

En levaduras se ha observado que los complejos que participan en el silenciamiento genético, particularmente la familia de las proteínas SIR, se localizan en los telómeros cerca de la periferia nuclear donde se encuentran en compartimentos. Se han identificado por lo menos dos proteínas que ayudan a que esto ocurra: una de ellas es el complejo Ku, el cual, al ser mutado en cualquiera de sus dos subunidades, impide la posición perinuclear del telómero. Además, se ha demostrado que la represión de genes reporteros baja a medida que se alejan de los telómeros (donde están concentrados los complejos represores). Estas evidencias apoyan y asocian el concepto de territorios y dominios. En *Drosophila*, se ha descrito un modelo en el cual se asocian los *insulators* y los elementos de respuesta Polycomb (Pc-G); estos últimos, involucrados en la represión de genes, pueden actuar en *trans* para mediar la represión y lo hacen a través de interacciones proteína-DNA y proteína-proteína con miembros de la familia Polycomb, en zonas definidas dentro del núcleo. Se ha propuesto que la organización y actividad de los *insulators* es influida por los elementos Pc-G, al establecer dominios subnucleares. Corces y colaboradores han demostrado una clara correlación entre la presencia del *insulator gypsy* y una localización subnuclear cercana y en la periferia del núcleo. Las evidencias van más allá, dado que demostraron que Su(Hw), el componente central de la acción del *insulator gypsy*, colocaliza con una alta frecuencia con la proteína laminina, componente estructural de la membrana nuclear (Gerasimova y cols., 2000).

Las evidencias mencionadas demuestran que en el núcleo debe existir una organización tal que permita la correcta regulación de *loci* independientes, facilitando el remodelaje de la cromatina, ya sea para que se active o se reprima la transcripción en un momento determinado del desarrollo y que los límites de los dominios sean elementos importantes para que esta organización se lleve a cabo de manera más eficiente. Además, los nuevos datos surgidos de estudios citológicos apoyan la idea de la necesidad de te-

ner elementos estructurales, ya sean membrana o matriz nuclear, para el anclaje de secuencias que favorezca una topología óptima, y así llevar a cabo la expresión de los genes contenidos en un dominio. Actualmente se han hecho estudios en los cuales se ha logrado comprobar que, además de los *insulators*, los *estimuladores* también contribuyen a la organización de los dominios dentro de un contexto cromosómico relocalizándolos lejos de regiones altamente represoras. A continuación se presentan las evidencias.

Relocalización

Recientemente, dos grupos de investigación independientes analizaron la posibilidad de que los *estimuladores* y los LCR contribuyan también a la regulación del dominio al relocalizarlo lejos de regiones de heterocromatina en el interior del núcleo. En el primer trabajo se tomó a uno de los sitios de hipersensibilidad, específicamente el 5'HS2 del *locus* β-globina humano, el cual anteriormente había sido caracterizado como un *estimulador* y en el que se identificaron varios sitios de unión a factores transcripcionales como GATA-1, NF-E2, AP1 y EKLF, y se realizaron mutaciones en sitios específicos para la unión a estos factores, aboliendo su unión. La meta de este estudio era tratar de contestar dos preguntas: primero, si la interrupción de la unión de factores abolía la actividad del *estimulador* y, segundo, si estas interrupciones afectaban la localización subnuclear de un transgén.

Se valieron de una técnica de recombinación homóloga para integrar a un transgén cuya expresión era dirigida por el HS2 completo o con las diversas mutaciones en los sitios de unión a factores, actuando en una región cercana al centrómero. Visualizaron al transgén en todos los casos mediante una técnica de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) y comprobaron su expresión; cuando el *estimulador* se encontraba intacto, de una manera estadísticamente significativa, demostraron que el transgén era relocalizado lejos del centrómero y se expresaba adecuadamente, lo que no pasaba en presencia del *estimulador* mutado. Concluyeron que se requiere un *estimulador* funcional tanto para suprimir el silenciamiento genético como para relocalizar a un gen lejos de la heterocromatina centromérica durante la interfase. Y que la supresión del silenciamiento requiere de la relocalización del transgén, lejos de las regiones de la heterocromatina (Francastel y cols., 1999).

Con base en estos resultados, se propuso un modelo en el cual los factores que se unen al *estimulador* posiblemente actúan reclutando y translocando al transgén a compartimentos nucleares o territorios donde existen factores y elementos basales de la transcripción en grandes concentraciones, por sus interacciones con éstos. A su vez, no se descarta la posibilidad de que alguno de los factores del *estimulador* reclute a complejos de acetilación, metilación o de remodelaje de la cromatina completando el ciclo regulador que lleve a la expresión regulada de un gen.

En el segundo trabajo, se analizó la posibilidad de que el LCR también estuviese involucrado en la apertura de la cromatina y en la activación transcripcional. El grupo de Groudine se valió de líneas celulares que te-

nían, por un lado, al LCR completo del *locus* β-globina (con los 5 sitios de hipersensibilidad) y, por otro, la deleción presente en la talasemia hispánica ΔHS1-HS5, y una línea celular donde ellos generaron una deleción más pequeña que abarcaba ΔHS2-5. Por medio de FISH analizaron si la ausencia del LCR afectaba a la determinación del *locus* y encontraron que ésta, en las líneas con el *locus* silvestre y las que tenían la deleción ΔHS2-5, se realizaba lejos del centrómero y tenía a las histonas H3 y H4 hiperacetiladas a lo largo del *locus* (Schübeler y cols., 2000). Estos datos indicaban que en realidad el LCR no era necesario para la localización del *locus,* lejos de la heterocromatina centromérica, ya que la línea celular con la deleción parcial del LCR (ΔHS2-5), también se localizaba lejos del centrómero, y además la sensibilidad al corte por la DNasa I se mantenía. Por otra parte, la hiperacetilación de las histonas H3 y H4 es característica de un *locus* β-globina que está abierto. Anteriormente, se había pensado que ésta era una característica que dependía del LCR, pero con los datos anteriores se demostró que el LCR no es necesario para esta acetilación. Por ello, infirieron que para la determinación del *locus,* lejos de la heterocromatina centromérica, mediaba una estructura más abierta y una hiperacetilación generalizadas del *locus,* y que estas actividades eran independientes del LCR. Por otro lado, la acetilación de H3 cerca del LCR en el *locus* silvestre, que es transcripcionalmente activo, es mucho mayor cuando el LCR se encontraba intacto. Estos datos sugirieron que el LCR no actúa directamente en mantener una estructura abierta de la cromatina, ni ayuda a alejar al *locus* de entornos heterocromáticos y, por lo tanto, represores, mas, sin embargo, podría actuar a otro nivel para regular la expresión del *locus*.

Esto crea una controversia en cuanto a lo que se conoce del LCR, ya que, en estudios realizados por Proudfoot (1997) y de manera independiente por Fraser (2000) y colaboradores, se demostró la presencia de transcritos intergenéticos, los cuales son dependientes de la integridad del LCR (Ashe y cols., 1997; Bulger y Groudine, 1999; Gribnau y cols., 2000). Estos dos grupos han propuesto que los transcritos intergenéticos contribuyen a la apertura de la cromatina, ya que se encuentran presentes a lo largo del *locus*, son estadio-específicos y sólo se encuentran en células donde el *locus* es expresado, es decir, células eritroides. Una de las explicaciones de los resultados que indican que el LCR no es necesario para la apertura del dominio, es que la regulación de la expresión del *locus* se da en varias etapas y posiblemente niveles, y que la combinación de los diferentes factores desempeña un papel importante para la regulación del *locus*. Actualmente, se están realizando diversos estudios para resolver esta controversia.



Conclusiones y perspectivas

Durante muchos años la transcripción y la estructura de la cromatina fueron considerados como dos tópicos de investigación independientes. Recientemente, nuestra visión ha cambiado y ahora podemos constatar cómo la regulación de la expresión de los genes depende plenamente de la estructura de la cromatina. En el presente capítulo hemos tratado de dar

una visión simplificada e integral de lo que son las RNA-polimerasas y el inicio de la transcripción. Decidimos presentar este vital proceso dentro de la vida de una célula en su contexto natural que es el de la cromatina. En lo que se refiere al inicio de la transcripción, en las últimas décadas se han identificado, purificado y clonado un gran número de factores, en particular factores ligados directamente a la actividad relacionada con el inicio de la transcripción por parte de la RNA-polimerasa II. Uno de los grandes avances en este campo ha sido el poder reconstituir el episodio de la transcripción mediante preparaciones homogéneas o cercanas a homogeneidad de dichos componentes. Por otra parte, este tipo de estrategia experimental ha sido complementada con estudios genéticos, en particular, en *Drosophila* (la mosca de la fruta) y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta combinación de estrategias ha permitido una disección detallada de los mecanismos por los cuales los factores de transcripción regulan la expresión de genes que codifican para proteínas funcionales. Muchos de los experimentos que han definido partes esenciales de estos mecanismos han sido realizados *in vitro*, es decir, en condiciones externas al contexto real de una célula. Se han podido complementar dichas observaciones con experimentos realizados *in vivo*, es decir, en un organismo completo, como por ejemplo, la levadura. En un futuro, las líneas de investigación que pudieran aportar mayores avances en el conocimiento sobre los mecanismos de activación transcripcional pueden ser básicamente dos. El primero, un análisis muy detallado y fino de diversos promotores y de sus componentes, al igual que otros elementos de regulación. Y segundo, los contactos macromoleculares responsables de dirigir la transcripción, a partir de promotores para la RNA-polimerasa II. De esta manera, se han podido conjuntar ambos tipos de observaciones para lograr un avance significativo en cómo se forma el complejo de preiniciación y el de iniciación de la transcripción. A pesar de todos los logros, aún queda mucho por entender.

Desde el punto de vista de la estructura de la cromatina y su efecto sobre la expresión genética, al parecer las investigaciones a futuro tienden a centrarse en tres tipos de enfoques: en las modificaciones de los componentes básicos de la cromatina (código de histonas), en estudios citológicos y estudios aplicables como la terapia genética. En los primeros, las modificaciones epigenéticas del genoma, es decir, los cambios en la expresión de genes sin que ocurran mutaciones en la secuencia de DNA, y que comprende las modificaciones de las histonas, los complejos de remodelaje ATP-dependientes y la metilación del DNA, son áreas de estudio de gran futuro. En los segundos se tendrá que dilucidar la relación entre los elementos de regulación de los dominios y los territorios cromosomales; al parecer, podemos imaginar una relación entre los *insulators*, MAR, *estimuladores* y LCR, con la relocalización de los dominios a sitios donde pueden ser transcritos con mayor eficiencia y, topológicamente, lejos o cerca (según sea requerido) de regiones potencialmente represoras dentro del núcleo. Esto ayudaría a entender mejor lo que hasta ahora ha permanecido como una caja negra: la manera cómo la arquitectura del núcleo favorece la formación de dominios y a tener una idea más clara de lo que ocurre realmente *in vivo,* en cuanto a la dinámica de la regulación de la expresión genética. Dentro de los

estudios aplicables estaría el análisis de los *insulators* y secuencias MAR como elementos con una importancia fundamental en la terapia genética. Como se mencionó anteriormente, el *insulator* 5'HS4 del *locus* β-globina de pollo está siendo utilizado para flanquear transgenes con resultados favorables. Podemos decir que éste es un claro ejemplo de cómo los estudios realizados en ciencia básica apoyan a la ciencia aplicada en medicina.

Referencias bibliográficas

Albright, S.R. y Tjian, R., "TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas", *Gene,* **242:** 1-13, 2000.

Allan, J.; Hartman, P.G.; Crane-Robinson, C. y Aviles F.X., "The structure of histone H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location", *J. Mol. Biol.,* **187:** 591-601, 1980.

Arents, G.; Burlingame, R.W.; Wang, B.W.; Love, W.E. y Moudriianakis, E.N., "The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **88:** 10148-10152, 1991.

——— y Moudrianakis, E.N., "Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **90:** 10489-10493, 1993.

Ashe, H.; Monks, J.; Wijgerde, M.; Fraser, P. y Proudfoot, N., "Intergenic transcription and transinduction of the human β-globin locus", *Genes Dev.,* **11:** 2494-2509, 1997.

Bell, A.C.; West, A.G. y Felsenfeld, G., "The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators", *Cell,* **98:** 387-396, 1999.

Benyajati, C. y Worcel, A., "Isolation, characterization and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*", *Cell,* **9:** 393-407, 1976.

Bestor, T.H., "The DNA methyltransferases of mammals", *Hum. Mol. Genet.,* **9:** 2395-2402, 2000.

Bird, A., "DNA methylation patterns and epigenetic memory", *Genes Dev.,* **16:** 6-21, 2002.

Blackwood, E.M. y Kadonaga, J.T., "Going the distance: a current view of enhancer action", *Science,* **281:** 61-63, 1998.

Bonifer, C., "Developmental regulation of eukaryotic gene loci", *TIG,* **16:** 310-315, 2000.

Boulikas, T., "Homeotic proteins binding sites, origins of replication and nuclear matrix anchorage sites share the ATTA and ATTTA motifs", *J. Cell Biochem.,* **50:** 1-7, 1992.

———, "Homeodomain protein binding sites, inverted repeats and nuclear matrix attachment regions along the human β-globin gene complex", *J. Cell Biochem.,* **52:** 23-30, 1993.

Boyes, J. y Felsenfeld, G., "Tissue-specific factors additively increase the probability of the all-or-none formation of a hypersensitive site", *EMBO J.,* **15:** 2496-2507, 1996.

Bulger, M. y Groudine, M., "Looping versus linking: toward a model for long distance gene activation", *Genes Dev.,* **13:** 2465-2477, 1999.

Buratowski, S. y Sharp, P., *Transcription regulation,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1992.

——— y Zhou, H., "Transcription factor IID mutants defective for interaction with transcription factor IIA", *Science,* **255:** 1130-1132, 1992.

Cheng, J.H.; Whiteley, M. y Felsenfeld, G., "A 5' element of the chicken β-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effects in *Drosophila*", *Cell,* **74:** 505-514, 1993.

Clark, K.L.; Halay, E.D.; Lai, E. y Burlaey, S.K., "Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA recognition motif resembles histone H5", *Nature,* **364:** 412-420, 1993.

Cockerill, P.N. y Garrard, W.T., "Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites", *Cell,* **44:** 273-280, 1986.

Comai, L.; Tanese, N. y Tjian, R., "The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1", *Cell,* **68:** 965-976, 1992.

Cormack, B.P. y Struhl, K., "The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells", *Cell,* **69:** 685-696, 1992.

Dahmus, M.E., "The role of multisite phosphorylation in the regulation of RNA polymerase II activity", *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.,* **48:** 143-179, 1994.

Dong, F. y Van Holde, K.E., "Nucleosome positioning determined by the (H3-H4)2 tetramer", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **88:** 10596-10600, 1991.

Ebralidse, K.K.; Grachev, S.A. y Mirzabekov, A.D., "A highly basic histone H4 domain bound to the sharply bent region of nucleosomal DNA", *Nature,* **331:** 365-367, 1988.

Farache, G.; Razin, S.V.; Rzeszowska-Wolny, J.; Moreau, J.; Recillas Targa, F. y Scherrer, K., "Mapping of structural and transcription-related matrix attachment sites in the α-globin gene domain of avian erythroblasts and erythrocytes", *Mol. Cell. Biol.,* **10:** 5349-5358, 1990.

Felsenfeld, G., "Chromatin unfolds", *Cell,* **86:** 13-19, 1996.

Francastel, C.; Walters, G, M. y Martin, D., "A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centromeric heterochromatin", *Cell,* **99:** 259-269, 1999.

Friedberg, E.C., "Relationships between DNA repair and transcription", *Ann. Rev. Biochem.,* **65:** 15-42, 1996.

Gamble, M.J. y Freedman, L.P., "A coactivator code for transcription", *Trends Biochem. Sci.,* **27:** 165-167, 2002.

Geiduschek, P.E. y Kassavetis, G.A., *RNA polymerase III transcription complexes,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 247-280, 1992.

Gerasimova, T.; Byrd, K. y Corces, V., "A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA", *Mol. Cell,* **6:** 1025-1035, 2000.

——— y Corces, V.G., "Boundary and insulator elements in chromosomes", *Curr Opin. Genet. Dev.,* **6:** 185-192, 1996.

Gilmour, D.S.; Diets, T.J. y Elgin, S.C.R., "UV crosslinking identifies four polypeptides that require the TATA box to bind to the *Drosophila* hsp70 promoter", *Mol. Cell. Biol.,* **10:** 4233-4238, 1990.

Goodrich, J.A.; Cutler, G. y Tjian, R., "Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription", *Cell,* **84:** 825-830, 1996.

——— y Tjian, R., "TBP-TATA complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription", *Curr. Opin. Cell. Biol.,* **6:** 403-409, 1994.

Gribnau, J.; Diderich, K.; Pruzina, S.; Calzolari, R. y Fraser, P., "Intergenic transcription and developmental remodeling of chromatin subdomains in the human β-globin locus", *Mol. Cell,* **5:** 377-386, 2000.

Grosveld, F.; Van Assendelf, G.B.; Greaves, D.R. y Kollias, G., "Position independent, high level expression of the human β-globin gene in transgenic mice", *Cell,* **51:** 975-985, 1987.

Hart, C.M. y Laemmli, U.K., "Facilitation of chromatin dynamics by SAR", *Curr. Opin. Genet. Dev.,* **8:** 519-525, 1998.

Hayes, J.J.; Bashkin, J.; Tullius, T.D. y Wolffe, A.P., "The histone exerts a dominant constrain on the structure of the DNA in a nucleosome", *Biochemistry,* **30:** 8434-8440, 1991a.

——— ; Clark, D.J. y Wolffe, A.P., "Histone contribution to the structure of DNA in a nucleosome", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **88:** 6829-6833, 1991b.

Hernandez, N., "TBP, a universal eukaryotic transcription factor?", *Genes Dev.,* **8:** 2868-2878, 1993.

Horikoshi, M.; Yamamoto, T.; Okhuma, Y.; Weil, P.A. y Roeder, R.G., "Analysis of structure-function relationships of the yeast TATA-binding factor TFIID", *Cell,* **61:** 1171-1178, 1990.

Kellum, R. y Schedl, P., "A position-effect assay for boundaries of higher order chromatin domains", *Cell,* **64:** 941-950, 1991.

——— , "A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer-blocking assay", *Mol. Cell. Biol.,* **12:** 2424-2431, 1992.

Klochendler-Yeivin, A.; Muchardt, C. y Yaniv, M., "SWI/SNF chromatin remodeling and cancer", *Curr. Opin. Genet. Dev.,* **12:** 73-79, 2002.

Koleske, A.J. y Young, R.A., "The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation", *Trends Biochem. Sci.,* **20:** 113-116, 1994.

Laemmli, U.K.; Kos, E.; Poljak, L. y Adachi, Y., "Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains", *Curr. Opin. Genet. Dev.,* **2:** 275-285, 1992.

Lamond, A. y Earnshaw, W., "Structure and function in the nucleus", *Science,* **280:** 547-553, 1998.

Lee, D.K.; Dejong, J.; Hashimoto, S.; Horikoshi, M. y Roeder, R.G., "TFIIA induces conformational changes in TFIID via interactions with the basic repeat", *Mol. Cell. Biol.,* **12:** 5189-5196, 1992.

Lemon, B. y Tjian, R., "Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control", *Genes Dev.,* **14:** 2551-2569, 2000.

Levy-Wilson, B. y Fortier, C., "The limits of the DNase I-sensitive domain of human apolipoprotein B gene coincide with the locations of chromosomal anchorage loops and define the 5' and 3' boundaries of the gene", *J. Biol. Chem.,* **264:** 21196-21201, 1989.

Luger, K.; Madre, A.W.; Richmon, R.K.; Sargent, D.F. y Richmon, T.J., "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution", *Nature,* **389:** 251-260, 1997.

Magdinier, F. y Wolffe, A.P., "Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent *p14/p16* locus in human neoplasia", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **98:** 4990-4995, 2001.

McKnight, S.L., "Mechanisms of Eukaryotic Transcription", copia revisada de un comentario sobre la Asamblea en 1995 de Cold Spring Harbor Laboratory, *Genes Dev.,* **10:** 367-381, 1996.

——— y Yamamoto, K.R., *Transcriptional Regulation,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1992.

Mirkovitch, J.; Mirault, M.E. y Laemmli, U.K., "Organization of the higher order chromatin loop: specific attachment sites on nuclear scaffold", *Cell,* **39:** 223-232, 1984.

Narlikar, G.J.; Fan, H.Y. y Kingston, R.E., "Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription", *Cell,* **108:** 475-487, 2002.

Nielsen, S.J.; Schneider, R.; Bauer, U.M.; Bannister, A.J.; Morrison, A.; O'Carrol, D.; Firestein, R.; Cleary, M.; Jenuwein, T.; Herrera, R.E. y Kouzarides, T., "Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters", *Nature,* **412:** 561-565, 2001.

Nikolov, D.B.; Hu, S.H.; Lin, J.; Gasch, A.; Hoffmann, A.; Horikoshi, M.; Chua, N.H.; Roeder, R.G. y Burley, S.K., "Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein", *Nature,* **360:** 40-46, 1992.

Orphanides, G.; Lagrange, T. y Reinberg, D., "The general transcription factors of RNA polymerase II", *Genes Dev.,* **10:** 2657-2683, 1996.

——— y Reinberg, D., "A unified theory of gene expression", *Cell,* **108:** 439-451, 2002.

Paule, M.R. y White, R.J., "Transcription by RNA polymerases I and III", *Nucl. Acids Res.,* **28:** 1283-1298, 2000.

Phi-Van, L. y Stratling, W.H., "Dissection of the ability of the chicken lysozyne gene 5' matrix attachment region to stimulate transgene expression and dampen position effects", *Biochemistry,* **35:** 10735-10742, 1996.

Pikaart, M.; Recillas Targa, F. y Felsenfeld, G., "Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators", *Genes Dev.,* **12:** 2852-2862, 1998.

Prioleau, M.N.; Nony, P.; Simpson, M. y Felsenfeld, G., "An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken β-globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene", *EMBO J.,* **18:** 4035-4048, 1999.

Pruss, D.; Hayes, J.J. y Wolffe, A.P., "Nucleosomal anatomy -where are the histones?", *BioEssays,* **17:** 161-170, 1995.

Pugh, B.F. y Tjian, R., "Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex", *Genes Dev.,* **5:** 1935-1945, 1991.

Ramakrishnan, V.; Finch, J.T.; Graziano, V.; Lee, P.L. y Sweet, R.M., "Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding", *Nature,* **362:** 219-223, 1993.

Rea, S.; Eisenhaber, F.; O'Carroll, D.; Strahl, B.D.; Sun, Z.W.; Schmid, M.; Opravil, S.; Mechtler, K.; Ponting, C.P.; Allis, C.D. y Jenuwein, T., "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases", *Nature,* **406:** 593-599, 2000.

Recillas Targa, F., "The chicken α- and β-globin gene domains and their chromatin organization", *Cell Mol. Biol. Lett.,* **5:** 451-467, 2000.

———; Bell, A.C. y Felsenfeld, G., "Positional enhancer-blocking activity of the chicken β-globin insulator in transiently transfected cells", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **96:** 14354-14359, 1999.

———; De Moure Gallo, C.V.; Huesca, M.; Scherrer, K. y Marcaud, L., "Silencer and enhancer elements located at the 3'-side of the chicken and duck α-globin-encoding gene domains", *Gene,* **129:** 229-237, 1993.

———; Pikaart, M.J.; Burgess-Beusse, B.; Bell, A.C.; Litt, M.D.; West, A.G.; Gaszner, M. y Felsenfeld, G., "Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken β-globin insulator are separable activities", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **99:** 6883-6888, 2002.

———; Razin, S.V.; De Moura Gallo, C.V.; Marcaud, L. y Scherrer, K., "Silencer and enhancer elements and the framing structures of the chicken α-globin gene domain", en *Hemoglobin Switching,* Prof. George Stamatoyanopoulos, ed., Intercepts, Reino Unido, 203-215, 1995.

——— y Razin, S.V., “Chromatin domains and regulation of gene expression: familiar and enigmatic clusters of chicken globin genes”, *Crit. Rev. Euk. Gene Exp.,* **11:** 227-242, 2001.

Reinberg, D. y cols., “The RNA polymerase II general transcription factors: past, present and future”, en *Mechanisms of Transcription,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 83-103, 1998.

Roeder, R.G., “Role of general and gene-specific cofactors in the regulation of eukaryotic transcription”, en *Mechanisms of Transcription,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 201-218, 1998.

Saitoh, N.; Bell, A.C.; Recillas Targa, F.; West, A.G.; Simpson, M.; Pikaart, M. y Felsenfeld, G., “Structural and functional conservation at the boundaries of the chicken β-globin domain”, *EMBO J.,* **19:** 2315-2322, 2000.

Sancar, A., “DNA excision repair”, *Ann. Rev. Biochem.,* **65:** 43-81, 1996.

Schaeffer, L.; Roy, R.; Humbert, S.; Moncollin, V.; Vermeulen, W.; Hoeijmakers, J.H.J.; Chambon, P. y Egly, J.M., “DNA repair helicase: a component of BTF-2 (TFIIH) basic transcription factor”, *Science,* **260:** 58-63, 1993.

Schild, C.; Claret, F.X.; Wahli, W. y Wolffe, A.P., “A nucleosome-dependent static loop potentiates estrogen-regulated transcription from the *Xenopus* vitollogenin B1 promoter *in vitro*”, *EMBO J.,* **12:** 423-433, 1993.

Schübeler, D.; Francastel, C.; Cimbora, D.; Reik, A.; Martin, D. y Groudine, M., “Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human β-globin locus”, *Genes Dev.,* **14:** 940-950, 2000.

Singal, R. y Ginder, G.D., “DNA methylation”, *Blood,* **93:** 4059-4070, 1999.

Smales, S.T., “Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation”, *Genes Dev.,* **15:** 2503-2508, 2001.

Starr, D.B. y Hawley, D.K., “TFIID binds in the minor groove of the TATA box”, *Cell,* **67:** 1231-1240, 1991.

Strahl, B.D. y Allis, D.C., “The language of covalent histone modifications”, *Nature,* **403:** 41-45, 2000.

Struhl, K., “Chromatin structure and RNA polymerase II connection: implications for transcription”, *Cell,* **84:** 179-182, 1996.

Triezenberg, S.J., “Structure and function of transcription activation domains”, *Curr. Biol.,* **5:** 190-196, 1995.

Usheva, A.; Maldonado, E.; Goldring, A.; Lu, H.; Houbavi, D.; Reinberg, D. y Alono, J., “Specific interaction between the nonphosphorylated form of RNA polymerase II and the TATA-binding protein”, *Cell,* **69:** 871-881, 1992.

Van Holde, K.E., *Chromatin,* Springer-Verlag, Nueva York, 1989.

Vázquez, J.; Farkas, G.; Gazner, M.; Udvardy, A.; Muller, M.; Hagstrom, K.; Gyurkovis, H.; Sipos, L.; Gausz, J.; Galloni, M.; Hogga, I.; Karch, F. y Schedl, P., “Genetic and molecular analysis of chromatin domains”, Cold Spring Harbor, *Symp. Quant Biol.,* **58:** 45-53, 1993.

Verrijzer, C.P.; Chen, J.L.; Yokomori, K. y Tjian, R. “Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II”, *Cell,* **81:** 1115-1125, 1995.

——— ; Yokomori, K.; Chen, J.L. y Tjian, R., “*Drosophila* TAFII150: similarly to yeast gene TSM-1 and specific binding to core promoter DNA”, *Science,* **264:** 933-941, 1994.

Von Kries, J.P.; Buhrmester, H. y Stratling, W.H., “A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification and mode of binding”, *Cell,* **64:** 123-132, 1991.

Weeda, G.; Van Ham, R.C.A.; Vermulen, W.; Bootsma, D.; Van der Erb, A.J. y Hoeijmakers, J.H.J., “A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in

the human DNA repair disorders Xerodema pigmentosum and Cockeyne's syndrome", *Cell,* **62:** 777-791, 1990.

West, A.G.; Gaszner, M. y Felsenfeld, G., "Insulators: many functions, many mechanisms", *Genes Dev.,* **16:** 271-288, 2002.

Wilson, C.; Bellen, H.J. y Gehring, W.J., "Position effects on eukaryotic gene expression", *Ann. Rev. Cell Biol.,* **6:** 679-714, 1990.

Wolffe, A.P., "Chromatin", Academic Press, 1993.

———— , "Insulating chromatin", *Curr. Biol.,* **4:** 85-87, 1994.

Zawel, L. y Reinberg, D., "Common themes in assemble and function of eukaryotic transcription factors", *Ann. Rev. Biochem.,* **64:** 533-561, 1995.

CAPÍTULO 5

GENES HOMEÓTICOS Y MECANISMOS MOLECULARES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

Francisco Vergara Silva ■ Caroline Burgeff d'Hondt
Liz Yazmín Izquierdo ■ Alicia Gamboa de Buen
Rosalinda Tapia-López ■ Luis Antonio Mendoza Sierra
María Elena Álvarez Buylla Roces

Los genes homeóticos constituyen un grupo de secuencias codificantes de factores de transcripción que participan en numerosos episodios regulatorios de la diferenciación de territorios celulares que, en los adultos de una amplia diversidad de especies de plantas y animales, dan lugar a estructuras morfológicas de gran interés desde el punto de vista taxonómico, sistemático y ecológico. En virtud de las relaciones filogenéticas de *Homo sapiens*, el desarrollo ontogenético de muchas estructuras anatómicas del cuerpo humano depende de ellos de manera fundamental, por lo que su estudio también es de interés médico. El descubrimiento de los principios generales de su actividad en diferentes sistemas modelo y especies selectas en ambos grupos de eucariontes multicelulares, ha tenido una influencia particular en la biología evolutiva contemporánea. Estos principios sustentan una base firme para establecer relaciones teóricas correctas entre las características estructurales y funcionales de los genomas, los mecanismos epigenéticos determinados por ellas y los procesos involucrados en el desarrollo ontogenético, en el contexto proporcionado por el patrón de divergencia de las especies, a lo largo del tiempo (Carroll y cols. 2001; Arthur, 2002). Sin duda, el entendimiento de aspectos fundamentales de la biología celular también se ha visto enriquecido de manera importante por los hallazgos moleculares alrededor de estos *loci* genéticos, toda vez que éstos indican que la elaboración morfológica que ha acompañado a dicha diversificación organísmica está basada en una impresionante conservación de mecanismos celulares (Gerhart y Kirschner, 1997).

> Los genes homeóticos constituyen un grupo de secuencias codificantes de factores de transcripción.



Aspectos históricos sobre el concepto de homeosis

Bateson: el inicio

> The first question which the Study of Variation may be expected to answer relates to the origin of that Discontinuity of which Species is the objective ex-

> pression. Such Discontinuity is not in the environment; may it not, then, be in the living thing itself?
>
> William Bateson, *Materials* (1894), p. 17.

En *Materials for the Study of Variation*, su obra de 1894, el investigador norteamericano William Bateson hizo uno de los recuentos generales más importantes de los modos en que la variación en la morfología de los organismos —anteriormente comprendida por Darwin (1859) como la base de una teoría sobre el origen de las especies— se presenta como un fenómeno de repetición serial y de organización de lo complejo, con base en unidades discontinuas. En este libro se presenta el término *homeosis* como una modificación del concepto de "metamorfía", que había sido empleado previamente por M.T. Masters para referirse a las anormalidades en la formación de algunos tejidos y órganos; en palabras de Bateson, aquellas instancias en que "...el ojo de un crustáceo es sustituido por una pata, o un pétalo por un estambre...". Este investigador veía la necesidad de usar una nueva palabra para definir el rasgo general de sus observaciones al respecto, pues,

En este libro se presenta el término *homeosis* como una modificación del concepto de "metamorfía", que había sido empleado previamente por M.T. Masters para referirse a las anormalidades en la formación de algunos tejidos y órganos.

> (...) the essential phenomenon is not that there has merely been a change, but that something has been changed into the likeness of something else (p. 85).

El interés de Bateson en el estudio de los mecanismos que construyen las características invariables de cada clase de organismo, a lo largo de las generaciones, lo llevó a darse cuenta de que los métodos embriológicos tendrían que orientarse por los principios de la incipiente teoría evolutiva. Con ello, sería posible superar las limitaciones que esa aproximación mecanicista había encontrado a principios del siglo XX para explicar la diversidad de la vida. El método de experimentación naturalmente complementario a esta búsqueda sería redescubierto unos cuantos años después de la publicación de *Materials*: nos referimos a la genética, también bautizada por Bateson.

Después del reconocimiento universal de la importancia de los hallazgos de Mendel, la visión batesoniana pudo haber desembocado en un programa concreto de investigación unificada. Pero, por desgracia, tanto la genética como la embriología desarrollarían a partir de las décadas de 1920 y 1930 sus propias líneas de evidencia, sus propios experimentos paradigmáticos, sus propios sistemas modelo, sus propias publicaciones y sus propios vocabularios (Gilbert y cols., 1996). En vista del inmenso poder de su enfoque, genetistas como T.H. Morgan se pronunciaron fuertemente por esta separación. Como una de varias consecuencias de esta postura, un grupo sobresaliente de biólogos y matemáticos redefinió la evolución, hacia el final de la década de 1940, como "el resultado de los cambios en las frecuencias genéticas" (Dobzhansky, 1937). Alrededor de esta premisa fundamental, estos investigadores constituyeron lo que conocemos actualmente como la Síntesis Moderna (Smocovitis, 1996), asumiendo que los mecanismos genéticos constituían la pieza de evidencia que le había hecho falta a Darwin, y dejando fuera de dicha síntesis a la embriología. A pesar de las voces disidentes de un puñado de heterodoxos, esta caracterización de la

evolución como un epifenómeno de la genética de poblaciones permaneció prácticamente sin modificaciones durante cuarenta años, al menos (ver, por ejemplo, Dobzhansky y cols., 1977; Gould, 1983).



Las primeras investigaciones experimentales

Evidentemente, no todos los estudios genéticos realizados a partir de entonces se concibieron como maneras de descubrir los mecanismos involucrados en la dinámica de los alelos en las poblaciones. En particular, la línea de investigación que sacaba ventaja de las bondades de *Drosophila melanogaster* —el sistema modelo inaugurado por el grupo de Morgan— habría de proporcionar los elementos para el descubrimiento, varias décadas más tarde, de la base material de las alteraciones homeóticas naturales descritas por Bateson. Estos experimentos se basaban fundamentalmente en el uso de agentes mutagénicos que producían efectos fenotípicos visibles en las moscas. Entre la gran variedad de sustancias empleadas en ellos, los mejores inductores de mutaciones resultaron ser los vapores de éter, el ácido bórico y los boratos de sodio y el 5-fluorouracilo, pues sus efectos eran fácilmente reproducibles (Ouweneel, 1976).

Con el tiempo, los investigadores notaron la adecuación del concepto de homeosis en la descripción del fenotipo resultante en muchas de las líneas mutantes y éstas fueron llamadas *homeóticas* en consecuencia. Para entonces, era también evidente que las transformaciones en la diferenciación de órganos enteros de la mosca, y de algunos otros artrópodos que comenzaban a explorarse experimentalmente, seguían patrones muy interesantes. En algunos casos, la homeosis entre las principales estructuras afectadas (los discos imaginales correspondientes a patas, antenas, labios, genitales, ojos, alas, halterios, abdomen y mesotórax), resultaba ser bidireccional, pero en otros únicamente procedía en un sentido. Asimismo, con el tiempo se encontró que ciertos tratamientos con calor, rayos X, luz ultravioleta y neutrones por bombardeo resultaban en fenotipos batesonianos. Las *fenocopias homeóticas*, como se les llamó a estas mutaciones fenotípicas, no parecían tener la misma base genética que las homeosis naturales y las primeras homeosis experimentales, y se les consideraba como relacionadas a los fenómenos de transdeterminación (Hadorn, 1968) y metaplasia (Yamada, 1972).



Goldschmidt, Waddington y Davidson: la importancia de la embriología

¿Cómo explicar la homeosis? ¿Por qué el mismo resultado fenotípico experimental podía alcanzarse por medios aparentemente tan dispares como mutaciones directas en el material hereditario y cambios de temperatura? Asimismo, ¿por qué a veces se trata de un proceso espontáneo, como observó Bateson?

La primera hipótesis explicativa sobre la homeosis basada en un mecanismo explícito de diferenciación celular fue propuesta por Richard

Goldschmidt en 1938. En su libro de 1940, *The Material Basis of Evolution,* este personaje lanzó un serio ataque en contra de la Síntesis Moderna, la ortodoxia reinante en la biología evolutiva, que menospreciaba el papel crucial del desarrollo embrionario en la diversificación organísmica. Los argumentos de Goldschmidt hacían referencia explícita a los fenotipos homeóticos y se basaban en experiencia personal, como lo demuestra su monografía sobre el mutante *podoptera* en *Drosophila* (Goldschmidt y cols., 1951), en el cual se observa el crecimiento de patas en el lugar que normalmente habría alas. Goldschmidt sugería que, en diferentes momentos durante el desarrollo de las larvas, una serie de "sustancias evocadoras" eran liberadas, determinando el destino adulto de aquellos discos imaginales que estaban "maduros" para tal proceso. Los evocadores, eminentemente extrínsecos según este modelo, circularían por la hemolinfa y afectarían únicamente las células de aquellas estructuras que ya habían alcanzado un estado de competencia. Esta hipótesis mecanística, sin embargo, estaba basada en evidencia preliminar y resultó ser errónea. Experimentos posteriores demostrarían que los discos imaginales pueden concluir su etapa larvaria separados de la irrigación hemolinfática, y que los discos homeóticos previamente establecidos como tales podían desarrollarse de manera autónoma dentro de larvas huéspedes silvestres (Ouweneel, 1976).

En general, las contribuciones de Goldschmidt relacionadas con los mecanismos del desarrollo embrionario cayeron en el olvido durante años debido a su insistencia en rechazar el modelo morganiano de los genes como "cuentas de collar" (Dietrich, 2000a). Como es bien sabido, esta visión de los genes se aceptó universalmente a partir de las investigaciones sobre la naturaleza química del material hereditario que se derivaron del trabajo de Watson, Crick y sus colegas cristalógrafos y bioquímicos de bacteriófagos. En paralelo, sus ideas generales sobre el proceso evolutivo —en especial, su definición de las macromutaciones como modificaciones fenotípicas discontinuas que son el resultado de cambios a gran escala en procesos embriológicos (Dietrich, 1992)— fueron constantemente combatidas e incluso ridiculizadas por los principales arquitectos de la Síntesis (particularmente por el ornitólogo alemán Ernst Mayr; ver, por ejemplo, Mayr, 1942 y 1997). Irónicamente, el curso que actualmente lleva la reconstrucción de la biología evolutiva, a partir de la incorporación de los hallazgos moleculares sobre los genes homeóticos (Vergara-Silva y Álvarez-Buylla, 2001; Vergara-Silva, 2002) y muchas otras evidencias embriológicas modernas han promovido recientemente un serio reexamen de la importancia de su trabajo (Dietrich, 1995). Este análisis ha desembocado en el reconocimiento de su lugar como uno de los pioneros en los esfuerzos por integrar a la genética, la embriología y la evolución (Dietrich, 2000b).

De manera totalmente independiente, el embriólogo inglés Conrad Waddington también sugirió a los evolucionistas de la Síntesis voltear la atención hacia la ontogenia, y fue el autor de la segunda hipótesis relevante sobre los posibles mecanismos de la homeosis (Waddington, 1940 y 1966). Guiado por la evidencia previa a su propio trabajo en *Drosophila*, donde saltaba a la vista que los evocadores eran muy posiblemente de naturaleza intrínseca, este investigador pensaba que la causa de las transformaciones

estaba en los mecanismos epigenéticos que operan dentro de los discos mismos (Waddington, 1942).

Uno de los aspectos que encontraba más llamativo en los órganos homeóticos era su carácter entero y discreto, en virtud del cual nunca presentan una identidad intermedia, así como el hecho de que se ven modificados por otras mutaciones del mismo modo que los órganos normales que crecen en los lugares característicos del taxón natural. Por esta razón, él se imaginaba que las vías de diferenciación de las diferentes estructuras morfológicas eran también discretas y que los genes respectivos (cualesquiera que éstos fueran) formaban sistemas genéticos coherentes e intensamente canalizados, que a su vez se activarían en un campo de células embrionarias gracias a la actividad temprana de un "gen maestro". Evidentemente, para Waddington los mejores candidatos para cumplir dicha función eran los genes homeóticos (Waddington, 1953). La noción de canalización —actualizada recientemente por Wilkins (1997) como "la estabilización de vías embriológicas mediante factores genéticos múltiples dentro del genoma"— es una de las herencias perdurables del pensamiento de Waddington. Sin duda, su comprensión aún espera estudios futuros que la relacionen apropiadamente con los conocimientos modernos sobre pleiotropía de *loci* cuantitativos y otros aspectos de la genética molecular contemporánea (Gibson y Wagner, 2000).

Los trabajos de Roy Britten y Eric Davidson merecen una mención por su relación con la búsqueda propuesta en los textos de Waddington. En los modelos de estos autores ya no se hablaba de "estructuras morfológicas" en general, sino específicamente de algunos de los segmentos de *Drosophila* que tradicionalmente mostraban la potencialidad de transformarse homeóticamente (Britten y Davidson, 1969). En resumen, dichos modelos postulaban que para cada una de cuatro diferentes regiones del plan corporal de *Drosophila* —el metatórax (o tercer segmento torácico, T3), dividido en sus porciones anterior y posterior, y los segmentos abdominales primero y segundo (A1 y A2, respectivamente)— existía un conjunto particular de "genes expresores" activados por una proteína alostérica (P) producida por alguno de los miembros del "juego de genes maestros integradores" (Davidson y Britten, 1971). Esta proteína tendría cuatro estados funcionales para la activación de cada uno de los conjuntos diferentes de expresores. Esta definición de estados se llevaría a cabo mediante la asociación de moléculas inductoras (I) a tres sitios alostéricos dentro de P. El elemento novedoso en esta idea es la postulación de un gradiente de I; en diferentes regiones del embrión, P se asociaría con una, dos o tres moléculas I y de ese modo activaría al grupo de genes expresores correpondiente. En este punto de la investigación sobre el fenómeno, ya se preveía que el aislamiento de un RNA mensajero (mRNA) correspondiente a alguno de los genes, cuya mutación estaba claramente involucrada en los cambios de identidad de los segmentos, podría ser de mucha ayuda para definir los porqués de la homeosis. Sin embargo, los conocimientos necesarios para llevar esto a cabo —como, por ejemplo, el mapeo de los cromosomas de las glándulas salivales— aún no existían de manera completa.

Varios años después, con el advenimiento de las tecnologías propias de la biología molecular —y gracias a algunos de los descubrimientos tratados

más adelante en el presente capítulo— las ideas de Davidson tomaron la forma de una teoría sofisticada sobre la manera en la que el desarrollo está codificado en el DNA, a través de las ediciones de 1976 y 1986 de su libro *Gene Activity in Development*. A últimas fechas, Davidson ha desarrollado un marco conceptual idiosincrásico —basado principalmente en sus propias investigaciones en el erizo de mar (ver, por ejemplo, Arnone y Davidson, 1997)— para entender la manera en que redes regulatorias complejas han participado en aspectos del desarrollo embrionario, que en su opinión han sido críticos durante la evolución de los metazoarios (Davidson, 2001). Es posible que su paradigma se vuelva aún más importante para las investigaciones futuras, hechas ya en el contexto de la secuenciación de genomas completos (Davidson y cols., 2002).



Las ideas de Lewis Wolpert

De manera simultánea con las contribuciones de Davidson, se propusieron otros mecanismos para explicar mecanísticamente el proceso natural de diferenciación, que se veía afectado mediante la mutación experimental de los genes homeóticos. Entre estos mecanismos sobresale el de los gradientes químicos. Esta propuesta tenía una larga historia, que comenzó con el trabajo de Boveri y Driesch, publicado a principios del siglo, pero no había estado acompañada de experimentos bien diseñados que permitieran probar su existencia. En los modelos ya mencionados arriba que hacían uso de la idea de un gradiente, la homeosis en sentido estricto no estaba bien diferenciada de la actividad de tales gradientes hipotéticos. Esta situación cambió, sin embargo, con el trabajo de Lewis Wolpert, otro embriólogo británico quien habría de proponer, en la forma de un modelo entero y coherente, un mecanismo universal para la traducción de la información genética en patrones espaciales de diferenciación: la ahora célebre *información posicional* (Wolpert, 1969, 1971 y 1994; Lawrence, 1992). Su modelo es un ejemplo de la transformación de una proposición ambigua en una idea fértil, y su consecuencia principal es la distinción entre las bases del fenómeno homeótico como tal y las fases del desarrollo embrionario previas e indispensables para la definición de la modularidad de los planes corporales (Wolpert, 1996).

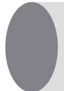
El mecanismo propuesto por Wolpert se basaba en la especificación de la posición de las células con respecto a uno o más "puntos de referencia" en un sistema en desarrollo. Como en todo modelo, el concepto central contaba con sus auxiliares. Así, por ejemplo, un *campo* fue definido por este autor como el conjunto de células que tiene especificada su información posicional con respecto a los mismos puntos de referencia, y la *polaridad* como la dirección en la cual la información posicional es medida o especificada. La versión más famosa del modelo de Wolpert es su solución al problema de cómo generar el patrón de colores de la bandera francesa, a partir de una hilera de tamaño indefinido, compuesta por células indiferenciadas y totipotenciales (Wolpert, 1971). Esta solución postula simplemente que las células de uno de los extremos de la hilera (por ejemplo, el izquierdo)

responden a una concentración alta del morfógeno desarrollando el color azul; conforme ésta va disminuyendo, se acerca a un umbral de concentración a partir del cual las siguientes células —las del centro— responden de modo diferente formando el color blanco. Finalmente, un segundo umbral es alcanzado y traspasado, y las células que quedan delante de él desarrollan entonces el color rojo. La aplicación conjunta de los principios definidos en este ejemplo al organismo real resulta en una guía susceptible de confirmarse empíricamente, según la cual los discos imaginales de *Drosophila* serían diferentes no en la especificación sino en la *interpretación* de la información posicional (Wolpert, 1994).

El organismo que habría de proporcionar los datos experimentales necesarios para justificar la relevancia biológica del concepto de información posicional sería la misma mosca de la fruta en una serie de investigaciones conducidas por Christiane Nüsslein-Volhard y Eric Wieschaus (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980). Experimentos de mutagénesis realizados por estos autores desde finales de la década de 1970, demostraron la existencia de una serie de genes de origen materno cuyos productos funcionan exactamente como los morfógenos de Wolpert se comportarían (Lawrence, 1992). Los mRNA de los genes maternos son especialmente importantes en este sistema biológico de información posicional, pues su actividad establece una serie de interacciones jerárquicas con los genes propios del cigoto, subdividiendo al embrión en unidades metaméricas cada vez más pequeñas a lo largo del eje anteroposterior, hasta llegar al número y forma característicos del adulto. A los genes responsables de esta fase del desarrollo se les conocería a partir de entonces como genes de polaridad del huevo y su distinción con respecto a los homeóticos quedó entonces corroborada de manera definitiva (Lawrence, 1992; Gerhart y Kirschner, 1997; Carroll y cols., 2001).

Como fruto de la investigación sobre los morfógenos de polaridad del huevo, se descubriría posteriormente que los gradientes de dichas sustancias controlan las primeras fases de la determinación de las cuatro distinciones fundamentales dentro del plan corporal de *Drosophila:* dorsal contra ventral, endodermo contra mesodermo y ectodermo, células germinales contra células somáticas y anterior contra posterior (Nüsslein-Volhard y cols., 1987; Nüsslein-Volhard, 1991; Lawrence, 1992). También se encontró que, entre la actividad de los genes de polaridad del huevo y los homeóticos, se encuentran niveles jerárquicos intermedios de genes a los cuales ahora conocemos como genes de segmentación (St. Johnston y Nüsslein-Volhard, 1992). Baste reiterar entonces que la importancia de mencionar dicho trabajo aquí radica en que se trata de la comprobación experimental del corolario principal del modelo de Wolpert: debido a que en los mutantes de polaridad del huevo se alteran las señales de posición a las cuales responden posteriormente las células embrionarias, es posible deducir que los genes homeóticos no son los responsables de dichas señales (Gerhart y Kirschner, 1997, Gilbert, 2000, Carroll y cols., 2001). Por la misma razón, es posible inferir que el proceso epigenético esencial en el desarrollo, desenmascarado simultáneamente por las dos clases de mutantes, se compone de dos partes: la generación de las fronteras de los campos y la determinación interna de sus identidades. Correspondería a dos de los más importantes genetistas

del siglo XX entender cabalmente la naturaleza de la segunda parte del proceso, es decir, la parte estrictamente homeótica y exponerla del modo que se acepta universalmente.



Edward B. Lewis: de los mapeos cromosómicos a los modelos evolutivos

Edward B. Lewis, alumno de la segunda generación de la escuela de Morgan (Winchester, 1996), fue uno entre varios de los investigadores que elaboraron hipótesis sobre los mecanismos genético-embriológicos en *Drosophila* con base en los fenotipos homeóticos. De hecho, él también elaboró una hipótesis preliminar basada en gradientes para explicar la homeosis (Lewis, 1963). Sin embargo, a su profundo conocimiento sobre la localización cromosómica de los *loci* que codificaban para los genes homeóticos de la mosca, el genetista norteamericano añadió de manera explícita una consideración de la filogenia de los organismos relevantes —el grupo taxonómico de los insectos— a la ontogenia del sistema modelo. Efectivamente, Lewis fue el primer investigador que ordenó los datos de la genética en *Drosophila* con los que entonces se contaba, con el objeto de construir una especulación sobre la existencia de cambios en la expresión de los genes homeóticos en los artrópodos a lo largo de la evolución (Lewis, 1963 y 1978).

Las investigaciones de Lewis se enfocaban en la región del cromosoma tres de *Drosophila* que conocemos con el nombre de complejo *bithorax* (BX-C). El nombre de la región proviene de uno de los fenotipos homeóticos clásicos, generado mediante la mutación de *Ultrabithorax*, uno de los tres genes que lo componen. En las moscas mutantes para este *locus*, el parasegmento 4 —abreviado P4, y correspondiente a la parte posterior de T1 y la anterior de T2, donde crecen las alas— se duplica en el lugar que correspondería normalmente a P5, donde normalmente crecen los halterios o balanceadores, dando como resultado una mosca con cuatro alas. Lewis había notado además que la eliminación del complejo en su totalidad producía una transformación homeótica generalizada, en la que todos los segmentos a partir de T3 se parecían a T2. Con estas evidencias, Lewis propuso en 1978 el modelo que le valdría la obtención del Premio Nobel de Medicina que, en 1995, compartió con Nüsslein-Volhard y Wieschaus. En este modelo se postulaba que BX-C debería contener al menos un gen para cada segmento por debajo de T2. Esto significaba que el desarrollo de T3 involucraría la activación de todos los genes característicos de T2 —"el nivel basal"—, además de la participación de uno o más genes responsables de las peculiaridades de T3. De manera similar, el desarrollo del primer segmento abdominal requeriría a su vez la expresión de los genes de T3, más aquellos específicos de A1, y así sucesivamente, hasta llegar a A8 (Lewis, 1978; Gilbert, 1988; figura 5-1).

En correspondencia con los fenotipos mutantes, y con base en las relaciones filogenéticas aceptadas para los diferentes tipos de insectos, Lewis propuso que algunos de los genes adicionales que se iban activando durante la ontogenia para suprimir las patas de los segmentos abdominales y for-

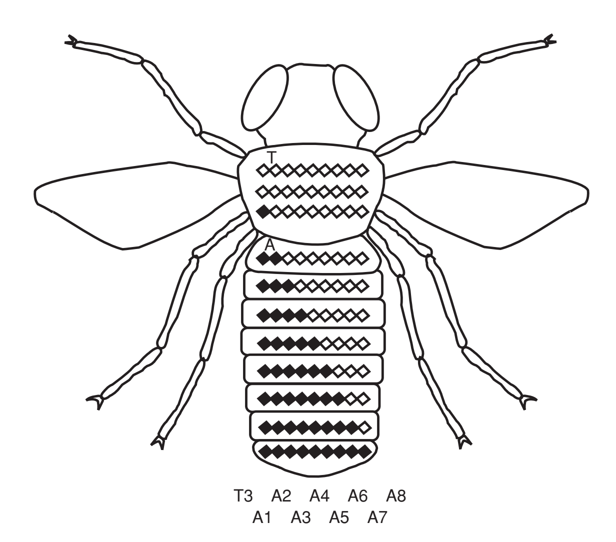


Figura 5-1. Representación esquemática del modelo de Edward B. Lewis acerca de la regulación genética del complejo *bithorax* y sus consecuencias sobre la especificación de identidades en los segmentos de *Drosophila*. El segundo segmento torácico (T2) es considerado el "estado basal". Para cada segmento posterior a éste, es activado un gen adicional. En el último segmento, todos los genes están activos. Modificado de Gilbert (1988). Ver el texto para una explicación más extensa.

mar halterios en posición posterior a las alas, eran los mismos que durante la filogenia habían aparecido para crear el plan corporal de un díptero, a partir, primero, de artrópodos ancestrales milípedos y, posteriormente, de insectos voladores con cuatro alas (Lewis, 1978 y 1998). La característica más notable de este modelo —a saber, su conexión directa entre la función de los genes y el origen de estructuras morfológicas distribuidas de modo diferencial en las especies (Vergara-Silva, 2002)— es de fundamental importancia por haber animado a otros investigadores a pensar que tal vez el fenómeno homeótico era universal, no sólo en los términos morfológicos en los que había sido documentado por Bateson, sino también en sentido molecular. En la actualidad, se reconoce además que el trabajo de Lewis en su conjunto ha proporcionado herramientas indispensables para comprender el desarrollo embrionario de *Drosophila*, en el contexto de la genómica comparada (Rubin y Lewis, 2000).



Antonio García-Bellido y el papel fundamental de las células

Mientras esto sucedía en Estados Unidos, el genetista español Antonio García-Bellido realizó contribuciones complementarias de enorme trascendencia para la comprensión de los mecanismos que determinan la diferenciación de los campos de células en *Drosophila* (García-Bellido, 1968 y 1975). Sus contribuciones se derivaron de sus experimentos con la mutación *engrailed* (García-Bellido, 1998). Actualmente sabemos que la expresión del *locus* correspondiente a dicha mutación es muy importante para la división dentro de cada segmento de las porciones anterior y posterior, que son las verdaderas fronteras de los parasegmentos. A principios de la década de 1970, él y sus colaboradores observaron que, en respuesta a una señalización posicional de naturaleza aún desconocida, grupos enteros y clonales de células formaban una región cohesiva que no se mezclaba con regiones

adyacentes ni permitía la entrada de células extrañas. Estas regiones, que bautizó como *compartimentos*, comenzaban con una sola célula que se dividía hasta formar la región entera (García-Bellido y cols., 1973 y 1979).

Este investigador, quien durante una temporada colaboró con Lewis (García-Bellido y Lewis, 1976) había observado además que las mutaciones homeóticas obtenidas por otros genetistas transformaban dominios de células que eran exactamente iguales en composición a los compartimentos definidos en el fenotipo silvestre de sus moscas. Con base en estas evidencias, propuso entonces que cada célula fundadora y sus descendientes expresaban una combinación única y particular (no necesariamente progresiva con respecto a un estado basal, como decía Lewis) de “genes (homeóticos) selectores”, que se mantiene fija a lo largo del proceso de generación del campo, y que puede interpretarse como un “domicilio genético” (García-Bellido, 1981). Esta interpretación equivaldría a una codificación binaria, es decir, consistiría en activaciones o inactivaciones de los genes como únicas alternativas, suficientes y necesarias. Este proceso de decisión binaria podría repetirse más tarde en el desarrollo, cuando, de acuerdo con la ontogenia natural de los organismos, fuera necesario subdividir aún más un campo para formar una subestructura morfológicamente diferente de sus vecinas. Las elegantes concepciones de García-Bellido han perdurado prácticamente sin modificaciones hasta la fecha (ver, por ejemplo, Lawrence y Struhl, 1996) como la mejor manera abstracta de representar la actividad conjunta de genes para la especificación de la diferenciación celular, y su trabajo experimental se considera fundamental para la articulación del “dogma central de la formación de patrones tisulares” (Irvine y Rauskolb, 2001). Las contribuciones de García-Bellido son de gran interés para los biólogos celulares estudiosos de los mecanismos que subyacen al desarrollo embrionario, pero sus ideas sobre el proceso evolutivo —aunque menos conocidas— también son dignas de atención (ver, por ejemplo, García-Bellido, 1984).



El estado de la investigación antes de 1984

En resumen, la investigación sobre la función de los genes de polaridad del huevo y los genes de segmentación con el tiempo demostró que la expresión del segundo grupo de secuencias es necesaria y suficiente para determinar, independientemente de la influencia materna, las fronteras de las regiones naturales de transcripción de los genes homeóticos selectores en sentido estricto (Akam, 1987; Ingham, 1988). Así pues, estos últimos pudieron definirse inequívocamente a partir de entonces —con base en la evidencia genética— como aquellos que están principalmente involucrados en establecer la identidad definitiva de las diferentes regiones previamente individualizadas en el embrión de *Drosophila* y posteriormente en el cuerpo del futuro adulto (García-Bellido, 1975; García-Bellido y cols., 1979). Como hemos visto, el mapeo genético de los homeóticos empezó en la época de Lewis, y su resultado final había reafirmado, aun antes de conocer su naturaleza molecular, que estos *loci* están organizados en dos complejos con-

tiguos sobre el cromosoma 3 correspondientes a la región 84 a 89. Estos complejos son el ya mencionado BX-C y un segundo complejo conocido como *Antennapedia* (ANT-C; Lawrence, 1992).

Ultrabithorax (*Ubx*), *abdominal A* (*abdA*) y *abdominal B* (*AbdB*) son los genes que componen el primer complejo, mientras que ANT-C consiste de cinco unidades de transcripción —*labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pbd*), *deformed* (*Dfd*), *sex combs reduced* (*Scr*) y *Antennapedia* (*Antp*; McGinnis y Krumlauf, 1992; Gilbert, 2000). Las propiedades funcionales básicas de estos grupos de genes, estudiadas durante décadas con metodologías puramente genéticas, se habían ratificado ya en 1978, en el trabajo clásico de Lewis (ver también Lewis, 1998): BX-C controla las diferencias entre los segmentos abdominales y torácicos, mientras que ANT-C determina las que existen entre las regiones cefálica y torácica. Con García-Bellido, de manera complementaria se había confirmado, además, que cada gen homeótico selector tiene un dominio característico de acción, que se define como la región del cuerpo que se transforma homeóticamente como resultado de la mutación en ese gen. Finalmente, también se había establecido que las fronteras espaciales de estas regiones coinciden perfectamente con los límites de los parasegmentos, definidos a su vez por la actividad de dos subclases de genes de segmentación: los genes pair-rule y los genes de polaridad de segmentos (Gerhart y Kirschner, 1997; Carroll y cols., 2001).

Con la ventaja que proporciona la retrospectiva que ahora podemos hacer de la historia de la genética del desarrollo, es fácil comprender que muchos investigadores sospechaban que la jerarquía genética establecida entre todos los tipos distintos de genes de formación de patrones debería basarse en alguna característica funcional básica y común a todas o al menos a la mayoría de las proteínas codificadas. En otras palabras, los productos de los genes de formación de patrones, y de los homeóticos en particular, deberían tener la capacidad de regular, de algún modo, a un número potencialmente gigantesco de genes, muchos de los cuales cumplirían las funciones bioquímicas básicas en las células. García-Bellido había bautizado ya a estos últimos como “genes realizadores” (García-Bellido, 1975 y 1984) y aun antes habían sido considerados por Britten y Davidson con el nombre de “genes expresores”. A pesar de las incisivas intuiciones y de las cualidades de los modelos genéticos propuestos por estos autores, sin embargo, el descubrimiento final de la base molecular de la función de los genes homeóticos y sus implicaciones en términos filogenéticos habrían de resultar completamente inesperadas.



Aspectos estructurales y funcionales de los *loci* homeóticos en plantas y animales

El descubrimiento de la caja homeótica

En una serie de trabajos publicados en el simbólico año de 1984 (aunque ya anunciados previamente en congresos durante 1983), los grupos de investigación de Walter Gehring (en Suiza) y de Matthew Scott (en Estados Uni-

dos), comunicaron el aislamiento y secuenciación de los primeros representantes de los genes componentes de los complejos homeóticos (Gehring, 1994; McGinnis, 1994). Estas investigaciones se sustentaron en el trabajo sistemático de mapeo de Lewis y del grupo de Thomas Kauffman (Kauffman y cols., 1980), así como en las técnicas de caminata sobre cromosomas desarrolladas en el laboratorio de David Hogness (Bender y cols., 1983) y en las técnicas de hibridización de ácidos nucleicos. La experiencia de estos investigadores en el campo de la homeosis era amplia: todos ellos habían participado desde tiempo atrás en la clonación de las regiones de mayor importancia en los cromosomas politénicos, de acuerdo con el mapeo genético de ANT-C. En dos de estos artículos (McGinnis y cols., 1984; Scott y Weiner, 1984), los genes caracterizados provenían de *Drosophila*, pero en un tercero (realizado en el sapo *Xenopus laevis*; Carrasco y cols., 1984) se mostraba, por primera vez, que los genes involucrados en los procesos embriológicos mediante los cuales se establecen las identidades de las partes corporales características de un insecto, son miembros de la misma familia de genes que cumplen una función similar en un anfibio.

> Los genes involucrados en los procesos embriológicos, mediante los cuales se establecen las identidades de las partes corporales características de un insecto, son miembros de la misma familia de genes que cumplen una función similar en un anfibio.

Después de hacer una comparación de las secuencias de ciertos fragmentos cuidadosamente mapeados de *Antp*, *Ubx* y *fushi tarazu* (*ftz*), Gehring y sus colaboradores notaron que todas ellas compartían una región muy similar de aproximadamente 180 pares de bases de longitud, bautizada primero por este investigador como “H” y posteriormente con el nombre de homeobox (caja homeótica), con que se le conoce universalmente (Duboule, 1994). En sólo unos cuantos años a partir de la caracterización de esos primeros genes homeobox, se han encontrado ya un número cercano a 700 secuencias provenientes de animales con marcos abiertos de lectura que presentan una región homeobox homóloga por descendencia común (Spirov y cols., 2002). Si bien las funciones embriológicas específicas de estos genes divergen en distintos aspectos, conforme se muestrea la filogenia de los eucariontes multicelulares (Carroll y cols., 2001), se ha demostrado que su distribución abarca no sólo al reino animal entero sino también a las plantas, los hongos y muy probablemente algunas especies de bacterias (Bürglin, 1994, 2001).

> La caja homeótica codifica para un segmento polipeptídico de 60 aminoácidos, al cual consecuentemente se le conoce como *homeodominio*.

La caja homeótica codifica para un segmento polipeptídico de 60 aminoácidos, al cual consecuentemente se le conoce como *homeodominio*. Una vez identificados los primeros homeodominios en términos puramente estructurales, rápidamente se postuló una hipótesis de trabajo según la cual los productos de los genes homeóticos serían justamente proteínas regulatorias, cuya actividad normal en las células sería la de comportarse como factores de transcripción que se asociarían a secuencias *cis*-regulatorias específicas de sus genes blanco (Gehring, 1985 y 1994). La evidencia fundamental para construir esta hipótesis consistió en la notable similitud encontrada entre los homeodominios conocidos a la fecha y algunos motivos característicos de proteínas regulatorias de procariontes, en especial, el motivo hélice-vuelta-hélice de las proteínas MAT a-1 y alfa-2, que determinan el tipo de apareamiento en la levadura (Laughon y Scott, 1984; Gehring y cols., 1994). En virtud de que este motivo es precisamente una región de asociación al DNA, Gehring supuso que el homeodominio tambien lo sería.

Como decíamos en líneas anteriores, una gran cantidad de datos ha confirmado esta hipótesis (McGinnis y Krumlauf, 1992; Pabo y Sauer, 1992; Gehring y cols., 1994) para el caso de los productos de los genes homeóticos e incluso la ha extendido a los morfógenos que organizan la polaridad del huevo y los episodios iniciales de la segmentación.

Las secuencias con homeodominios se agrupan en más de 200 grupos homólogos o parálogos (Spirov y cols., 2002). Algunas de estas clases están definidas con base en criterios adicionales, entre los que se cuentan los tipos de región que flanquean a la caja, la posición de los intrones y la asociación con otros dominios (Gehring y cols., 1994). Así pues, se incluyen en dicha clasificación algunas agrupaciones de genes —como los *Pax* y los *POU*— que, además de contener una caja homeótica reconocible como tal, incluyen regiones adicionales de asociación a DNA, así como aquellos grupos que representan a los genes homeobox que no están organizados en complejos cromosómicos ordenados (De Robertis, 1994). Los componentes principales del homeodominio son tres hélices α plegadas alrededor de un centro hidrofóbico y un brazo N-terminal flexible (Otting y cols., 1990); en el caso del homeodominio de la proteína ANTP, también se puede reconocer una cuarta hélice flexible (Qian y cols., 1993). Las hélices 2 y 3 forman el motivo hélice-vuelta-hélice ya mencionado (Qian y cols., 1989; Gehring y cols., 1994), y se ha visto que las tres hélices se ordenan únicamente cuando la proteína se pega al DNA (Wolberger, 1996).

> Los componentes principales del homeodominio son tres hélices α plegadas alrededor de un centro hidrofóbico y un brazo N-terminal flexible.

La información anterior proviene de estudios estructurales realizados con resonancia magnética nuclear (NMR) y cristalografía de rayos X de los complejos formados por el DNA y homeoproteínas escogidas, complementados en algunos casos con mutaciones puntuales en la secuencia de la caja homeótica (revisados en Laughon, 1991; Gehring y cols., 1994; Sharkey y cols., 1997). Estos trabajos han establecido además que los residuos de aminoácidos que participan en la formación del complejo —en particular, en el reconocimiento específico de las bases en ambas cadenas del DNA— están ubicados en la hélice 3 (Gehring, 1992). La secuencia de consenso obtenida por Bürglin (1994) de la comparación de 346 homeodominios contiene siete posiciones que son invariantes en más de 95% de los casos; se trata de L16, F20, W48 y F49, correspondientes al centro hidrofóbico, y R5, N51 y R53, que se asocian directamente al DNA. En el homeodominio de ANTP, por ejemplo, es claro que estos sitios están distribuidos en las cuatro hélices. La primera abarca los residuos 10 a 21, la segunda va del 28 al 38 y la tercera de los residuos 42 al 52. Como ya se indicó, esta proteína contiene una cuarta hélice (residuos 53 a 59), más desordenada y flexible, que es inexistente en otros factores de transcripción, como FTZ, codificada por uno de los genes de segmentación más importantes y mejor estudiados (Qian y cols., 1994), o bien que es continua con la tercera, como sucede en MAT alfa-2 (Wolberger y cols., 1991). A pesar de estas diferencias, los estudios llevados a cabo con estas técnicas han indicado que éstas tres proteínas, más el producto de *engrailed* (Kissinger y cols., 1990; Draganescu y Tullius, 1998), se unen al DNA de manera muy similar.

Los homeodominios mencionados anteriormente y otros (ver, por ejemplo, Klemm y cols., 1994) se pegan al DNA como monómeros y lo ha-

cen de manera especialmente favorable a secuencias de DNA que contienen el tetranucleótido ATTA, llamado también motivo central. La interacción requiere de la inserción de la tercera hélice en el surco mayor, el brazo N-terminal en el menor y de contactos entre el asa que une a las hélices 2 y 3 con el esqueleto del DNA. En opinión de algunos autores, las regiones de DNA que pegan homeodominios se pueden considerar de alta, media y baja afinidad, pues en algunos casos, en ausencia del sitio que contiene el tetranucleótido en el *estimulador* disminuye la especificidad en la asociación de la proteína, aunque la función de este elemento activador no se vea afectada de manera detectable (Gehring y cols., 1994). Junto con estas evidencias que involucran la asociación de subunidades únicas, recientemente se ha establecido que las interacciones proteína-proteína desempeñan un papel importante en la modulación de la actividad de los homeodominios en condiciones fisiológicas (Wolberger, 1996). De hecho, los monómeros sólo tienen 100 veces más afinidad por sitios específicos del DNA (de alta afinidad) en relación a sitios no específicos (de media y baja afinidad; Laughon, 1991). Algunas homeoproteínas se unen al DNA como dímeros formados por subunidades iguales o diferentes en una asociación cooperativa, pues la afinidad aparente de cualquiera de ellas al DNA es mayor si se forma el dímero (Wilson y Desplan, 1995; Passner y cols., 1999). Las estructuras cristalinas del homodímero del homeodominio codificado por *paired* (Wilson y cols., 1995) y las del heterodímero de MAT a-1/alfa-2 (Li y cols., 1995) han sido importantes evidencias en favor de lo anterior. En el caso de esta última estructura, se ha visto que cada subunidad se une a secuencias operadoras de DNA distintas —los nucleótidos TGT están conservados en el sitio de alfa-2, y la secuencia CATC lo está en el sitio de a-1.

Finalmente, otros estudios de NMR y simulación de dinámicas moleculares, también en ANTP, indican que el agua solvente yace en una cavidad que forma la interfase entre la hélice de reconocimiento del homeodominio y las bases del surco mayor del DNA de doble cadena (Billeter y cols., 1993, Fraenkel y Pabo, 1998). Uno de los últimos homeodominios en estudiarse como cristal ha demostrado la participación conjunta del solvente y las interacciones entre homeodominios en la dinámica molecular de los mismos: la asociación de la proteína EVEN SKIPPED —también codificada por un gen de segmentación— al DNA es en realidad el pegado de dos homeodominios sobre caras opuestas de una sola vuelta de B-DNA, con puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua en la interfase entre las bases y la hélice de reconocimiento (Hirsch y Aggarwal, 1995).



Biología comparativa de los genes *homeobox*

Una cantidad enorme de estudios realizados en años recientes en varias especies de animales con muy diferentes planes básicos de organización corporal ha permitido establecer que no sólo el desarrollo de *Drosophila* está mediado por genes reguladores que poseen secuencias de asociación al DNA, a través de las cuales controlan la expresión de otros genes (Slack y cols., 1993; Carroll, 1995; Carroll y cols., 2001). Al mismo tiempo, dichas

investigaciones han indicado que un porcentaje considerable de tales secuencias codificantes de factores de transcripción importantes durante el desarrollo pertenece a la familia de genes homeobox. En la rana, el ratón e incluso en el humano, los genes del tipo *Antp* —la categoría de genes homeobox que abarca los genes homeóticos *sensu stricto* (Gehring y cols., 1994)— presentan parecidos asombrosos con los genes selectores de *Drosophila,* más allá de las secuencias nucleotídicas: en los genomas de vertebrados estudiados en detalle, se encuentran cuatro "racimos" (*clusters*) o complejos cromosómicos conocidos como *Hox*, que corresponden a BX-C y ANT-C (denominados conjuntamente HOM-C por algunos autores) y que están distribuidos en cuatro cromosomas distintos (McGinnis y Krumlauf, 1992; Maconochie y cols., 1996) como producto de tres rondas de duplicación y la pérdida de cuatro racimos (Bailey y cols., 1997) ocurridas a lo largo de los últimos cientos de millones de años de evolución (figura 5-2).

Las secuencias codificantes de factores de transcripción importantes durante el desarrollo pertenecen a la familia de genes homeobox.

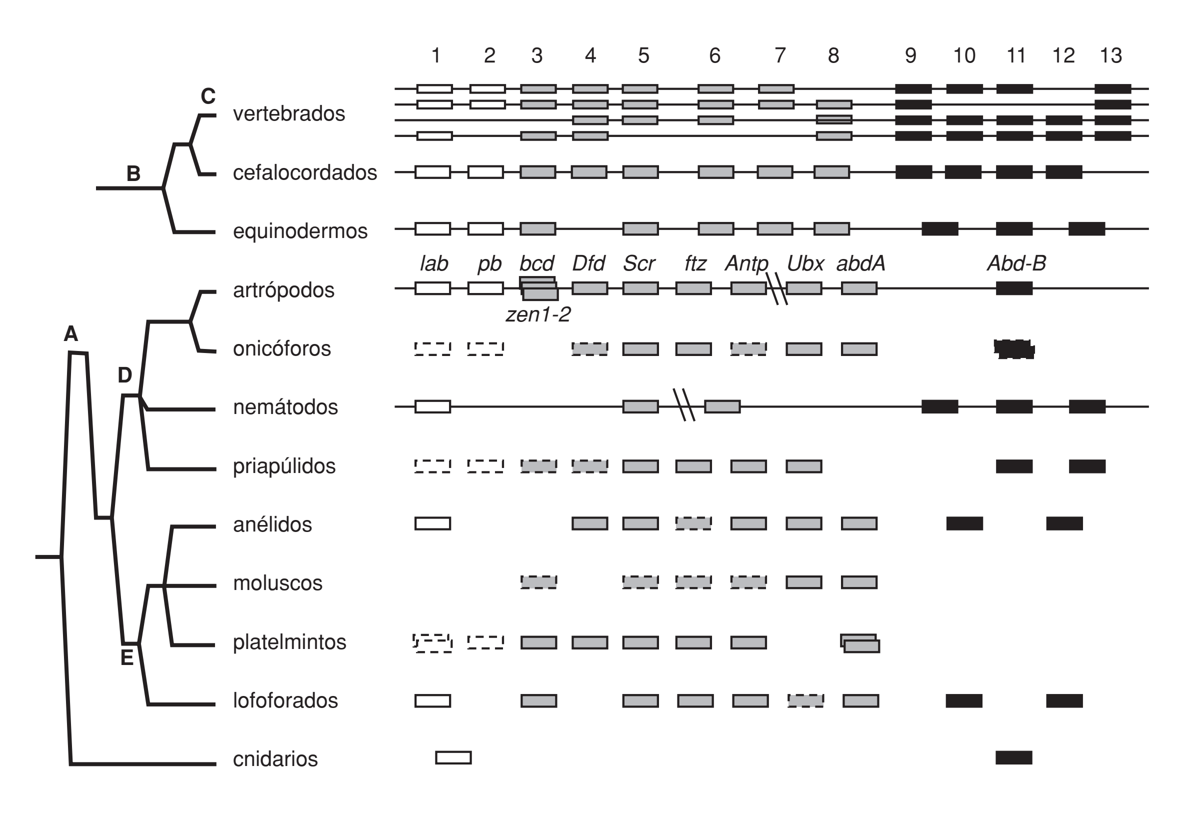


Figura 5-2. Evolución de los genes *Hox* en los metazoarios. La distribución de los genes *Hox* en diversos grupos de animales se muestra con cuadros organizados en columnas, que corresponden a los diferentes grupos parálogos descritos (derecha). Asimismo, se representa la clasificación de los mismos en anteriores (blanco), centrales (gris claro) y posteriores (gris oscuro). Esta distribución se correlaciona con una reconstrucción filogenética reciente (izquierda). Sobre esta última, se han mapeado cinco episodios importantes en la historia evolutiva de la familia multigénica: (A) expansión de los genes *Hox* centrales; (B) expansión de los genes *Hox* posteriores; (C) episodios de tetraploidización genómica; (D) origen de los genes *Ubx* y *Abd-B* (caracterizados originalmente en *Drosophila*); finalmente, origen de los genes *Lox5*, *Lox2/4* y *Post1/2* (caracterizados originalmente en los anélidos). Modificado de Carroll y cols., 2001.

Los genes *Hox* están agregados en racimos.

A pesar de que la razón por la cual los genes *Hox* están agregados en racimos sigue siendo misteriosa (Mann, 1997), este arreglo cromosómico da lugar a propiedades notables, como la colinearidad. Este rasgo funcional consiste en la correspondencia entre la posición de cada *locus* perteneciente a los complejos sobre cada cromosoma y el orden en el cual cada uno de ellos es expresado a lo largo del eje anteroposterior. Esto significa que los genes que se encuentran en el extremo 3' se expresan en la región anterior del embrión, y que sus fronteras de localización espacial se van recorriendo hacia atrás del cuerpo, conforme se avanza sobre el cromosoma hacia el extremo 5'. Asimismo, dicha correspondencia incluye también la temporalidad de la expresión (los genes anteriores se expresan primero, los posteriores se expresan de forma tardía). Un elemento adicional de similitud entre los genes homeóticos homeobox provenientes de las especies estudiadas, es la correlación que existe entre la responsividad al ácido retinoico, que tanto en invertebrados como en vertebrados consiste en una alta sensibilidad mostrada por los genes del extremo 3' y un grado bajo de respuesta por los genes 5' (Duboule, 1994). Gracias a la conclusión de algunos proyectos de secuenciación de genomas completos —por ejemplo, el de *Drosophila* (Adams y cols., 2000) y el del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Kappen, 2000)— actualmente es posible estimar con gran confiabilidad el número de genes pertenecientes a la familia homeobox presentes en diferentes cladas de animales (Finnerty y Martindale, 1998; De Rosa y cols., 1999). Estas estimaciones se han visto complementadas por el hallazgo de grupos de genes homeobox que también forman racimos pero que no pertenecen a los complejos *Hox*; entre ellos sobresale el complejo *ParaHox*, descubierto originalmente en *Amphioxus* (Brooke y cols., 1998) y posteriormente caracterizado en los cnidarios (Finnerty y Martindale, 1999).

Los genes anteriores se expresan primero, los posteriores se expresan de forma tardía.

La aproximación comparativa ha permitido descubrir diferencias importantes en la función biológica de algunos genes homeóticos animales. En virtud de numerosas observaciones que indican que la extensa conservación de secuencia entre diferentes genes *Hox* no necesariamente se extiende a todos sus efectos sobre la especificación de la identidad de partes corporales, actualmente se tiene una visión equilibrada del peso que debe adjudicarse a los genes involucrados en el desarrollo embrionario en la elaboración de hipótesis de homología entre estructuras (Abouheif y cols., 1997; Wray y Abouheif, 1998). Por ejemplo, tanto en *Drosophila* como en *Tribolium castaneum* (otro insecto intensamente estudiado desde el punto de vista genético-molecular; ver, por ejemplo, Brown y cols., 1999), los genes homeóticos son los determinantes de la identidad de patas, alas y antenas, y de ellos depende su localización en los segmentos correctos (Akam, 1987 y 1995), pero el complejo de genes homeobox de *C. elegans* controla únicamente la identidad de linajes celulares particulares a lo largo del eje anteroposterior (Salser y Kenyon, 1994). Esta misma especie presenta un gen (*egl-5*) cercanamente relacionado con *AbdB*, el cual a su vez es el gen más emparentado con el grupo funcional de genes homeobox de los vertebrados, que es activado de manera secuencial durante el desarrollo de las extremidades (Morgan y Tabin, 1993; Capdevila e Izpisúa-Belmonte, 2001). Sin embargo, como los nemátodos carecen de ellas, es muy probable que el

gen ancestral de esta subfamilia haya antecedido al origen de las extremidades como tales, y que dicho gen haya cumplido en un principio con funciones diferentes de la especificación de dichas estructuras (Shubin y cols., 1997).

Entre los ejemplos más interesantes y discutidos al respecto de la asignación de funciones diferenciales a lo largo de la evolución para los genes con cajas homeóticas y sus consecuencias sobre la estimación de hipótesis de homología se encuentra el caso del *locus Pax6* y su homólogo *eyeless* (*ey*), provenientes del ratón y la mosca, respectivamente. Estos genes parecen ser centrales en la actividad de una red regulatoria que controla la morfogénesis del ojo en varios grupos de animales con estructuras oculares divergentes (Gehring e Ikeo, 1999; Treisman, 1999); entre otras funciones, *ey* es capaz de inducir el desarrollo de ojos ectópicos cuando se expresa en sitios donde normalmente no le corresponde (Halder y cols., 1995). Un segundo grupo de evidencias en favor de esta hipótesis se relaciona con la conservación de secuencias y funciones en el humano (Quiring y cols., 1994), los nemertinos (Loosli y cols., 1996), los cefalópodos (Tomarev y cols., 1997) y el anfioxo (Glardon y cols., 1998); asimismo, se ha demostrado que la vía de señalización que controla la expresión de *ey* y que es organizada por el gen *Notch* está conservada tanto en la rana como en la mosca (Onuma y cols., 2002).

Otros hallazgos, sin embargo, apuntan a que la participación central de los homólogos de *Pax6* en la ontogenia del ojo no es tan generalizada —por ejemplo, el desarrollo por regeneración de los ojos en las planarias es *Pax6*-independiente (Pineda y cols., 2002). Por este motivo, algunos autores actualmente piensan que, en el ancestro común de protostomados y deuterostomados —que no tenía aún ojos complejos, sino únicamente receptores fotosensibles—, el homólogo de *Pax6* estaba dedicado a determinar el destino de células sensoriales en tejido ectodermal, pero no de especificar ojos como tales (Nilsson, 1996). Recientemente, Arendt y Wittbrodt (2001) han sugerido que *Urbilateria* —el ancestro común hipotético de todos los animales bilaterales— ya poseía ojos simples, pero mientras la homología de los ojos cerebrales en Protostomia puede sustentarse, es probable que dichas estructuras no provengan de un ancestro común —al menos, la comparación hecha entre animales cordados y no cordados. El caso de los genes *Pax* y la determinación de la identidad de estructuras oculares ilustra, pues, que los genes homeóticos no hacen exactamente lo mismo en todas las especies en las cuales su función se ha estudiado en detalle. No obstante, esto no elimina la validez del consenso actual que afirma que los genes homeóticos, en virtud de sus funciones celulares, siempre han participado en algún aspecto del desarrollo de los planes corporales (Knoll y Carroll, 1999; Carroll y cols., 2001).

> Los genes homeóticos, en virtud de sus funciones celulares, siempre han participado en algún aspecto del desarrollo de los planes corporales.

La aplicación generalizada de una de las técnicas más comunes de la biología molecular —la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)— ha permitido la detección de genes *Hox* en cientos de especies, algunas de las cuales nunca serán accesibles a la aplicación de metodologías genéticas convencionales (ver, por ejemplo, De Rosa y cols., 1999). Aunque a veces la PCR no proporciona información inequívoca respecto al número de ge-

nes presente, las búsquedas realizadas con esta técnica en muy diversos genomas, interpretadas adicionalmente con evidencias paleobiológicas, han demostrado que la presencia de genes *Hox* precede a la aparición de los animales como tales (Valentine y cols., 1996; Erwin y cols., 1997; Valentine y cols., 1999) y que existe una correlación general entre el número de genes *Hox* estimado y la complejidad de los planes corporales (Gellon y McGinnis, 1998). Con ayuda de esta técnica, se sabe que el racimo de genes homeóticos homeobox de *C. elegans* tiene cuatro genes debido a pérdidas masivas ocasionadas por la condición de parasitismo (Kenyon, 1994), pero que en general todos los protostomados estudiados a la fecha presentan un solo racimo de genes *Hox* (Finnerty y Martindale, 1998; figura 5-2).

En contraste, la situación en los cordados (Holland y García-Fernández, 1996) es diversa: los mamíferos tienen 39 genes, repartidos en los 13 (McGinnis y Krumlauf, 1992; Maconochie y cols., 1996) o 14 (Pollard y Holland, 2000; Popovici y cols., 2001) grupos de genes parálogos a los miembros de BX-C y ANT-C; algunos peces tienen genes adicionales debido a duplicaciones génicas exclusivas (Amores y cols., 1998), mientras que el anfioxo tiene sólo un complejo (Ferrier y cols., 2000). El panorama general al respecto indica que cada *phylum* o clase taxonómica en la que se han caracterizado los complejos *Hox* exhibe un patrón único de duplicación o pérdida de genes, relativo a otros *phyla* y clases (Finnerty y Martindale, 1998; Martindale y Kourakis, 1999; De Rosa y cols., 1999); si bien cada uno de los complejos de los vertebrados es diferente de los demás, se ha podido rastrear de manera consistente su origen a un racimo ancestral único (Bailey y cols., 1997; Ferrier y Holland, 2001).

Finalmente, es importante recalcar que actualmente la interpretación correcta de la información que proporcionan la PCR y las técnicas genéticas y embriológicas tradicionales sobre los genes homeóticos homeobox depende de modo indispensable del uso de las herramientas de la sistemática, especialmente de la cladística (Carroll y cols., 2001; Arthur, 2002). Esta relación entre áreas diversas que confluyen en la biología evolutiva está plenamente justificada: finalmente, son estos genes los principales responsables de la determinación de la identidad de las estructuras morfológicas características de cada grupo, las cuales a su vez han sido tradicionalmente la fuente de caracteres de la sistemática en el pasado. De modo sobresaliente, los datos de secuencia de genes *Hox* no sólo han podido ser mapeados en reconstrucciones obtenidas con *loci* independientes, sino que ellos mismos han contribuido para la modificación de las hipótesis filogenéticas tradicionales de los animales en su conjunto (ver, por ejemplo, Adoutte y cols., 1999; De Rosa y cols., 1999; figura 5-2). La adición de evidencias sobre las modalidades de evolución molecular de los genes *Hox* (ver, por ejemplo, Schubert y cols., 1993; Gauchat y cols., 2000) a los análisis anteriores está apoyando la unificación de la genética molecular del desarrollo con las otras áreas de la biología relacionadas con el estudio de la macroevolución: tal unificación es, en nuestra opinión, la inevitable culminación de las observaciones de Bateson y una vía para la superación de las limitaciones de la teoría evolutiva tradicional (Vergara-Silva, 2002).



Las plantas también tienen *loci* homeóticos: la familia MADS-box

El resumen que hemos hecho de la historia del descubrimiento de los genes homeóticos en los animales, y la descripción de algunos de los aspectos moleculares más relevantes sobre ellos, bien pueden crear la impresión de que los términos homeótico y homeobox son sinónimos, y que la reunión de la genética, la embriología y la sistemática sólo pueden ayudar a resolver preguntas acerca del origen y diversificación de los metazoarios. Lo anterior está lejos de ser cierto: la aplicación de la metodología genético-molecular a algunas especies modelo de dicotiledóneas —*Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*, en especial— ha permitido el hallazgo de una segunda familia multigenética, cuyas funciones conjuntas bien pueden considerarse análogas a las de los genes homeóticos en los animales. Al igual que los genes homeobox, la agrupación de genes MADS-box (Theissen y cols., 2000; Vergara-Silva y cols., 2000) tiene una amplia distribución taxonómica, e incluso, además de su papel fundamental en la morfogénesis de las estructuras de las plantas terrestres, algunas de las proteínas codificadas por estos genes participan en la respuesta a feromonas y en el metabolismo de arginina en levadura (Herskowitz, 1989; Dubois y Messenguy, 1991), así como en el desarrollo de los tejidos musculares en animales (Buckingham, 1994).

Al igual que los genes homeobox, la agrupación de genes MADS-box tiene una amplia distribución taxonómica.

La familia multigenética MADS-box deriva su nombre de las iniciales de sus cuatro miembros fundadores —*MCM1* (proveniente de *Saccharomyces*; Jarvis y cols., 1989), *AGAMOUS* (*AG;* un gen hallado en *Arabidopsis*; Yanofsky y cols., 1990), *DEFICIENS* (que se encuentra en *Antirrhinum*; Sommer y cols., 1990) y *SERUM RESPONSE FACTOR* (*SRF*; un gen del humano, Norman y cols., 1988)—, y agrupa a las secuencias codificadoras de factores de transcripción que presentan un dominio formado por 60 aminoácidos denominado MADS (Schwarz-Sommer y cols., 1990). En un principio, se consideraba que la unidad mínima de unión específica al DNA estaba constituida por este dominio —el más conservado de toda la proteína— más 30 a 40 aminoácidos en la región carboxilo-terminal (Mueller y Nordheim, 1991). Gracias al trabajo cristalográfico realizado con la proteína codificada por *SRF*, se sabe ahora que el dominio MADS se pliega en un motivo estructural nuevo para la interacción con el DNA y para la dimerización que consiste en un rizo enrollado antiparalelo de dos hélices α anfipáticas, cada una proveniente de una subunidad diferente (Pellegrini y cols., 1995).

La familia multigénica MADS-box deriva su nombre de las iniciales de sus cuatro miembros fundadores y agrupa a las secuencias codificadoras de factores de transcripción que presentan un dominio formado por 60 aminoácidos denominado MADS.

Al igual que los homeodominios, el dominio MADS presenta una serie de sitios muy conservados dentro de su secuencia. El recuento de 107 proteínas pertenecientes a plantas, hongos y animales ha permitido identificar que I11, K23, R24, K30, K31, E34 y L38 son residuos absolutamente invariantes, así como 9 residuos más, donde los cambios de aminoácido han sido muy raros y conservativos, y finalmente 16 sitios de cambios no conservativos en menos de 5% de los casos (Theissen y cols., 1996).

El dominio MADS presenta una serie de sitios muy conservados dentro de su secuencia.

Las proteínas con dominios MADS de plantas son de naturaleza modular. Además de este dominio, existe en ellas una región parcialmente con-

servada, de aproximadamente 70 residuos, denominada K (por su similitud con el dominio de rizo enrollado presente en la queratina), que se localiza en la dirección 3' con respecto al dominio MADS y se separa de esta última por una región de secuencia muy variable denominada I (*intermediary*) o L (*linker*). Aunque la secuencia de aminoácidos de la región K no está muy conservada, su estructura secundaria sí lo está (Ma y cols., 1991; Purugganan y cols., 1995). Por último, las regiones más variables en términos de tamaño y secuencia —tanto en animales como en plantas y hongos— corresponden a la región amino y carboxilo-terminal. De éstas, la primera región sólo se halla en un pequeño grupo de proteínas MADS, pues en la mayoría de ellas el codón de metionina de inicio coincide exactamente con el principio de la región del mismo nombre, mientras que en todas ellas se encuentra el extremo carboxilo (Theissen y cols., 1996).

Empleando la información del genoma completo de *Arabidopsis* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) y el de especies selectas de animales, en nuestro laboratorio hemos podido reconstruir la historia evolutiva de la familia de los genes MADS-box en los eucariontes. En particular, hemos demostrado que, antes de la divergencia de los animales y las plantas, ocurrió al menos una duplicación de los genes MADS-box que dio lugar a dos linajes —los genes Tipo I y los Tipo II— dentro de la familia (Álvarez-Buylla y cols., 2000a). Estos dos tipos de genes corresponden, respectivamente, a dos agrupaciones de *loci* animales conocidas como tipo SRF y tipo MEF, ninguna de las cuales tiene funciones homeóticas. Por un lado, los genes de animales tipo SRF se agrupan con un gran número de genes de plantas de los cuales aún no conocemos su función. Por el otro, es interesante notar que los genes tipo MEF —entre los que se encuentran genes que regulan la diferenciación del corazón y otros músculos estriados— forman un grupo monofilético con un grupo grande de genes MADS-box de plantas, dentro del cual se encuentran los genes homeóticos florales.

Es común que las proteínas con dominio MADS sean activas como pares, tanto homodímeros como heterodímeros.

Es común que las proteínas con dominio MADS sean activas como pares, tanto homodímeros como heterodímeros (Riechmann y cols., 1996b; Riechmann y Meyerowitz, 1997; Winter y cols., 2002). Se ha establecido, por ejemplo, que los productos de los genes *APETALA3* (*AP3*) y *PISTILLATA* (*PI*), caracterizados en *Arabidopsis* (Jack y cols., 1992 y 1994; Goto y Meyerowitz, 1994; Bouhidel e Irish, 1996) pueden formar heterodímeros, así como sus contrapartes en *Anthirrinum* (las proteínas *deficiens* y globosa) que requieren específicamente del dominio K, además del MADS, para interactuar (Davies y cols., 1996). Todas estas proteínas son fundamentales para la determinación de la identidad de algunos de los órganos florales característicos de las especies correspondientes. Trabajos recientes han demostrado, sin embargo, que no sólo los dominios MADS y K desempeñan un papel en la función celular normal de los factores de transcripción florales. La construcción de genes híbridos acoplada con algunos experimentos de expresión ectópica en plantas transgenéticas de *Arabidopsis* han demostrado que el único dominio que siempre participa en la determinación de la especificidad funcional de las proteínas es la región I (Krizek y Meyerowitz, 1996). Probablemente, esto se deba a que dicho dominio se requiere para la interacción con otras proteínas accesorias que formarían entonces un com-

plejo múltiple de proteínas-DNA que activa la transcripción (Riechmann y Meyerowitz, 1996a).

Tal como ha sucedido con las proteínas con homeodominios, diversas estrategias experimentales han permitido demostrar que existe una secuencia conservada en los promotores y otras regiones activadoras de los genes blanco de las proteínas con dominio MADS y funciones homeóticas, a la cual éstas se asocian con diferentes grados de afinidad. Dicha secuencia de nucleótidos es un motivo palindrómico denominado caja CArG, que consiste en la secuencia consenso CC(A/T)6GG (Shore y Sharrocks, 1995). Si bien es común que se piense que la especificidad funcional de los factores de transcripción reside básicamente en su especificidad de asociación al DNA, se ha observado que muchas proteínas MADS-box reconocen prácticamente los mismos sitios CArG en el DNA (Nurrish y Treisman, 1995; Huang y cols., 1995) a pesar de que su efecto en el desarrollo sea muy diferente (Riechmann y Meyerowitz, 1997). Curiosamente, esta paradójica situación se ha venido descubriendo también para las proteínas homeóticas con homeodominios de los animales (Gross y McGinnis, 1996).

La importancia de determinar las causas de la especificidad de los factores de transcripción codificados por genes homeobox y MADS-box en estos términos es enorme: en principio, ésta es la única manera de acceder al siguiente nivel de las interacciones regulatorias en el desarrollo, es decir, el de los genes realizadores (ver, por ejemplo, Parcy y cols., 1998; Benfey y Weigel, 2001). Por esta razón, una gran parte de los proyectos de investigación sobre la base molecular de la homeosis —tanto en animales como en plantas— ahora se enfocan en la caracterización de procesos que, junto con la regulación de la transcripción *per se*, controlen de manera fina la actividad de las proteínas homeóticas dentro de las células (Gerhart y Kirschner, 1997). Entre los procesos descubiertos durante estos proyectos sobresalen la degradación selectiva de las proteínas mismas, el transporte del citoplasma al núcleo, el movimiento de célula a célula y otras modificaciones postranscripcionales y postraduccionales como la fosforilación, así como la participación de proteínas accesorias y cofactores en los complejos activadores de la transcripción, ya mencionada arriba, se perfila como la regla (Graba y cols, 1997; Riechmann y Meyerowitz, 1997; Egea Gutiérrez-Cortines y Davies, 2001).



Los genes MADS-*box* y la evolución de las estructuras reproductivas de las plantas terrestres

El rápido avance en la caracterización molecular de las proteínas con dominio MADS de las plantas ha puesto las bases para la comparación de los detalles moleculares de la función de ésta y otras familias de factores de transcripción que también son importantes durante el desarrollo ontogenético (Riechmann y cols., 2000). A su vez, estos análisis comparativos han creado la posibilidad de analizar los episodios evolutivos más importantes en la historia de las plantas terrestres en términos de la expresión de los genes durante el desarrollo, a semejanza de lo realizado para el reino animal (Cronk,

2001). También, esta nueva manera de entender los procesos evolutivos vegetales es guiada por el conocimiento que se obtiene en los sistemas modelo. Tanto en *Arabidopsis* como en *Antirrhinum*, la estructura cuya morfogénesis se conoce mejor en términos moleculares es la flor —la estructura reproductiva diagnóstica de la clada de las angiospermas. Dilucidar las razones del origen de esta novedad evolutiva es uno de los problemas clásicos de la biología desde tiempos de Darwin, quien le llamaba "el misterio abominable" (Crepet, 1998).

Las flores silvestres hermafroditas —es decir, las que presentan simultáneamente órganos masculinos y femeninos— de *Arabidopsis* y *Antirrhinum* se componen de cuatro verticilos concéntricos, dispuestos en la siguiente secuencia desde la periferia hasta el centro: sépalos, pétalos, estambres y carpelos (figura 5-3). Un número considerable de mutaciones en genes que codifican para factores de transcripción de la familia MADS-box cambian el arreglo de los órganos florales de manera homeótica, y se ha encontrado que sus correspondientes genes se requieren para una o más de tres diferentes funciones: (1) el control directo de la identidad de los órganos, probablemente mediado por la activación de los genes realizadores característicos de las células de cada órgano, (2) la regulación espacial de la expresión de los genes que controlan la identidad del órgano, que puede entenderse como la regulación de la posición, y (3) la inducción inicial de los genes que especifican la identidad de los órganos. Los genes del primer tipo —de identidad de los órganos— son equivalentes a los genes homeóticos selectores de los animales, y el producto de sus mutaciones es una drástica modificación de la fórmula floral. Por su parte, los genes con la segunda actividad se llaman catastrales, porque establecen límites espaciales para los genes anteriores, impidiendo su expresión ectópica. Por último, los genes que inducen positivamente a los del primer tipo se llaman genes de identidad meristemática, porque la ausencia de su actividad causa una conversión parcial o completa de las flores hacia vástagos vegetativos (Weigel y Meyerowitz, 1994; Weigel, 1995; Yanofsky, 1995).

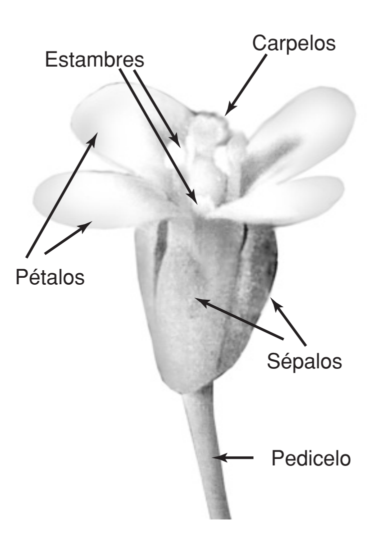


Figura 5-3. Flor silvestre de *Arabidopsis thaliana*, sistema modelo en genética molecular del desarrollo. Se muestran de afuera hacia adentro los cuatro tipos de órganos que forman este órgano característico de las angiospermas: sépalos, pétalos, estambres y carpelos.

Las mutaciones en los genes de identidad de los órganos son especialmente interesantes. Éstas caen en tres clases diferentes, cada una de las cuales altera la identidad de los órganos en dos verticilos adyacentes, de acuerdo con el modelo combinatorio conocido universalmente como ABC (Coen y Meyerowitz, 1991; Meyerowitz, 1994; figura 5-4). Este modelo es un resumen de la evidencia genética y molecular sobre el desarrollo floral en los dos sistemas modelo ya mencionados. Según el modelo ABC, a cada una de las tres funciones de identidad de órganos, A, B y C, le corresponde

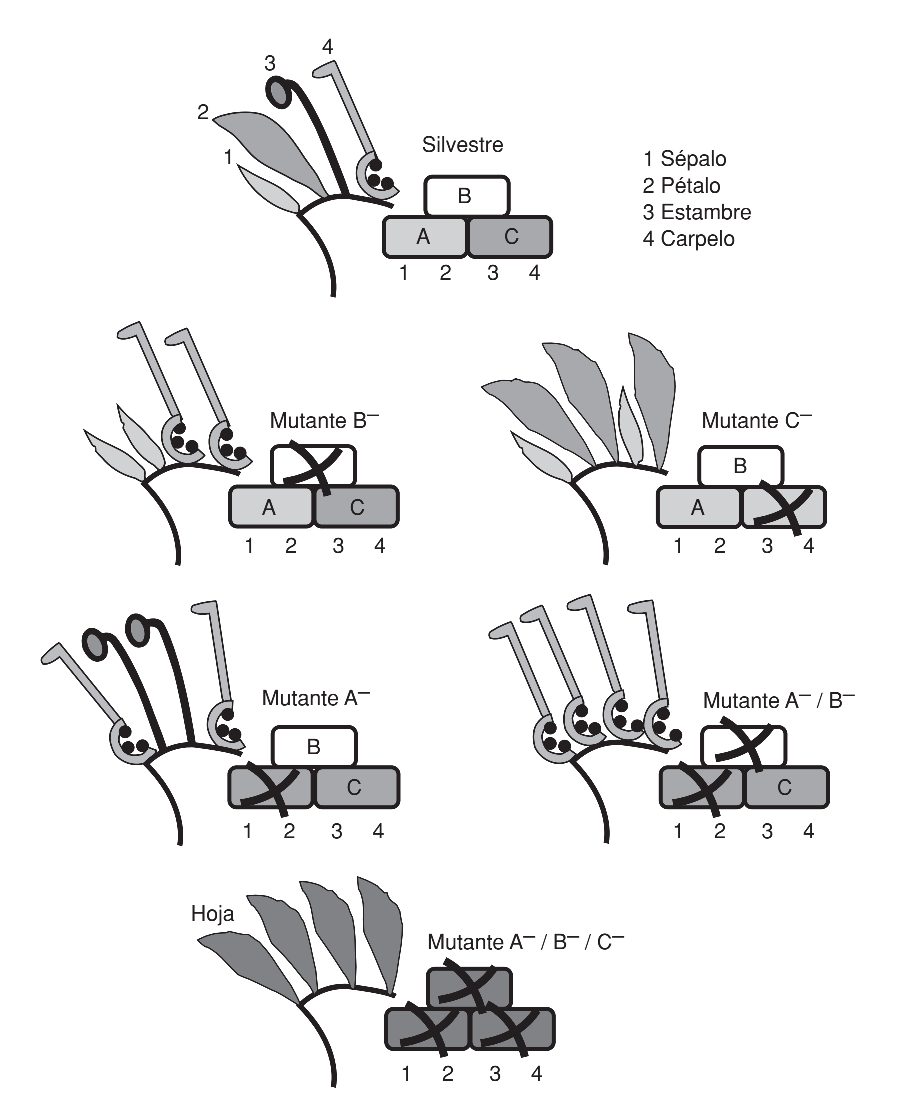


Figura 5-4. Modelo ABC de desarrollo floral. Se muestra la expresión de los genes de las funciones A, B y C en el tipo silvestre y los mutantes florales que resultan cuando se desactivan o mutan una o más de estas funciones. Ver texto para una explicación detallada.

una clase de genes particular. La inactivación de los genes de la clase A, es decir, la pérdida de la función marcada con la misma letra, causa la transformación de los sépalos en carpelos y de los pétalos en estambres. En los mutantes de pérdida de la función B, los pétalos son reemplazados por más sépalos y los estambres por más carpelos. Finalmente, la pérdida de la actividad C transforma a los estambres (tercer verticilo) en pétalos y a los carpelos (cuarto verticilo) en sépalos. En el contexto del mismo modelo, el estudio de los dobles mutantes posibles ha revelado que la actividad B es independiente de A y C, y que cuando desaparece la función C de las células que formarán los verticilos 3 y 4, A se expresa ectópicamente en esas mismas células y viceversa —es decir, las actividades A y C se inhiben mutuamente. Finalmente, el modelo también establece que los efectos de las diferentes actividades son independientes de su posición relativa dentro de la flor (Álvarez-Buylla, 2002). Sin duda, el modelo ABC se ha convertido en la mejor herramienta predictiva de los patrones de expresión de los

genes MADS-box en prácticamente todas las flores de las angiospermas conocidas, así como en las estructuras reproductivas de las gimnospermas (Vergara-Silva y cols., 2000).

Recientemente, se ha comunicado la existencia de un nuevo grupo funcional de genes de la familia MADS-box que tiene especial relevancia para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de especificación de la identidad de los órganos florales. Este conjunto de genes, agrupados en un clado monofilético, se ha denominado *SEPALLATA* (*SEP*), porque la mutación simultánea de todos ellos resulta en una conversión de los cuatro tipos de órganos florales a sépalos (Pelaz y cols., 2001). Adicionalmente, la sobreexpresión de estos genes, en combinación con la de los ABC, origina la transformación de hojas de la roseta u hojas caulinares en diferentes órganos florales, dependiendo de los genes ABC coexpresados. Por ejemplo, si se sobreexpresan dos de los tres genes *SEP* con los genes A y B, se transforman hojas en pétalos (Pelaz y cols., 2000), pero la combinación de cualquier par de *SEP* y los genes de las funciones B y C especifica la diferenciación de estambres o carpelos (Honma y Goto, 2001; Pelaz y cols., 2001).

Las evidencias resumidas arriba indican que los genes *SEP* son indispensables para redirigir el programa de desarrollo de hojas a órganos florales. Si bien se sabía ya que los genes ABC eran indispensables para el desarrollo de los órganos de la flor, ahora sabemos que estos genes no son suficientes y que requieren de la función conjunta de los genes *SEP*. Estos interesantes genes MADS-box, sin embargo, no regulan transcripcionalmente a los genes ABC. De hecho, la localización de sus mRNA es normal en los mutantes de los *SEP*. Experimentos recientes han permitido demostrar, en contraste, que éstos actúan de manera redundante en la formación de cuartetos de proteínas junto con diferentes productos proteicos de los genes ABC, para así pegarse a sitios de los promotores de los genes blanco que regulan (Honma y Goto, 2001). Estos genes blanco no se han identificado aún, pero sabemos ahora que los genes ABC necesitan interactuar con los genes *SEP* para funcionar como factores transcripcionales. Con estos datos se ha integrado lo que se conoce como el "modelo de los cuartetos" del desarrollo floral, que plantea que los genes ABC actúan en tetrámeros como factores de transcripción (Theissen y Saedler, 2001). Datos empíricos en *Antirrhinum*, donde los genes ortólogos de los *SEP* han sido llamados "intermediarios de identidad", también apoyan este modelo (Egea-Cortines, 1999; Gutiérrez-Cortines y Davies, 2000).

Las etapas de la ontogenia de las plantas que ocurren previamente al desarrollo floral son notablemente plásticas, y responden constantemente a factores ambientales como la luz y la temperatura. A nivel molecular, ya se tiene información acerca de las conexiones entre diferentes redes de regulación transcripcional que controlan la floración y las vías de transducción de señales que responden a estos factores ambientales (ver, por ejemplo, Blázquez, 2000). Sin embargo, en términos bioquímicos es poco lo que se sabe acerca de otros factores que no pertenecen a la familia de proteínas con dominio MADS y que podrían regular la función transcripcional y postranscripcional de éstas. En relación a este interesante aspecto de la ontogenia vegetal, en nuestro laboratorio hemos emprendido una búsqueda de

proteínas que puedan regular postranscripcionalmente a los genes MADS-box durante el desarrollo floral y que con el tiempo se puedan convertir en herramientas moleculares para entender la manera en que se regula el desarrollo vegetal por las condiciones externas. Hasta el momento, hemos aislado dos proteínas: una de ellas es rica en motivos de leucina y la otra es una fosfatasa. Ambas interactúan *in vitro* de manera específica con *AG*, que es el gen correspondiente a la función C en *Arabidopsis* (Gamboa y cols., 2002). Éste es el primer informe de proteínas codificadas por genes que no son de la famila MADS-box que interactúan con una proteína con dominio MADS. Las proteínas ricas en motivos de leucina se han asociado a funciones del desarrollo y funcionan como cinasas y/o como receptores (ver, por ejemplo, Clark y cols., 1997). Ahora nos queda averiguar la función de esta nueva proteína que bautizamos FLOR1.

Así como en *Drosophila*, en *Arabidopsis* también existen genes que regulan la actividad de los genes homeóticos selectores. Entre ellos, se encuentran los genes *CONSTANS* (*CO;* Putterill y cols., 1995) y *GIGANTEA* (*GI;* Fowler y cols., 1999), que junto con otros *loci* se conocen como genes de floración tardía (Weigel y Meyerowitz, 1994; Blázquez, 2000). Estos genes, a su vez, regulan la actividad transcripcional de los genes de identidad de meristemo *LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*AP1*), *CAULIFLOWER* (*CAL*) y *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*; Weigel y Meyerowitz, 1994; Coupland, 1995; Blázquez, 2000). Estos últimos son los que controlan la actividad de los genes catastrales *CLAVATA1* (*CLV1*), *LEUNIG* (*LUG*) y *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*; Levin y Meyerowitz, 1995; Liu y Meyerowitz, 1995; Blázquez, 2000). Por último, tanto los genes de identidad de meristemo como los catastrales regulan la expresión de los genes de identidad de órgano *APETALA2* (*AP2*), *AP3*, *PI* y *AG* (Weigel y Meyerowitz, 1994). Este esquema temporal de expresión tiene sus particularidades, sin embargo; por ejemplo, el gen *SUPERMAN* (*SUP*) se activa después que los genes de identidad de órgano, a pesar de ser considerado formalmente como un gen catastral (Sakai y cols., 1995). Por su parte, el gen *AP1* realiza funciones de especificación de la identidad del meristemo floral, además de determinar la identidad de sépalos y pétalos (Weigel, 1995).

El trabajo en angiospermas que no son sistemas modelo —basado en técnicas de biología molecular similares a las empleadas en animales para muestrear en especies donde no se puede hacer genética— ha permitido la caracterización de decenas de genes MADS-box que también están involucrados en la morfogénesis de las estructuras reproductivas correspondientes. Entre estas especies podemos contar al arroz (*Oryza sativa*, Chung y cols., 1994), la coliflor (*Brassica napus*, Mandel y cols., 1992), el maíz (*Zea mays*, Schmidt y cols., 1993; Ambrose y cols., 2000), la papa (*Solanum tuberosum*, Kang y Hannapel, 1995), la petunia (*Petunia hybrida*, Angenent y cols., 1992; Immink y cols., 1999 y 2002), *Rumex acetosa* (Ainsworth y cols., 1995), el tabaco (*Nicotiana tabacum*, Mandel y cols., 1994) y el tomate (*Lycopersicon esculentum*, Pnueli y cols., 1994), así como algunas dicotiledóneas basales (Kramer y cols., 1998; Kramer e Irish, 1999).

Por otra parte, en gimnospermas como la conífera *Picea abies* (Tandre y cols., 1995; Tandre y cols., 1998; Sündstrom y cols., 1999) y las gnetales *Gne-*

tum parvifolium (Shindo y cols., 1999) y *Gnetum gnemon* (Winter y cols., 1999) ya se han encontrado secuencias con caja MADS ortólogas de los genes homeóticos florales canónicos. Este último estudio, además de sugerir que la conservación de aspectos importantes de la regulación genética de la morfogénesis de órganos reproductivos se extiende más allá de las angiospermas, ha reforzado los cambios que ha sufrido recientemente la hipótesis de relaciones filogenéticas más aceptada para la clada de las espermatofitas (Winter y cols., 1999). El más notable de estos cambios es la agrupación de gimnospermas y angiospermas como grupos monofiléticos y hermanos entre sí (ver, por ejemplo, Chaw y cols., 2000). A este respecto, no sólo los genes MADS-box han sido de utilidad, sino también los que codifican a los factores de transcripción del tipo *LFY*. En especial, se ha encontrado que las gimnospermas poseen un gen adicional perteneciente a esta familia denominado *NEEDLY* (*NLY*; Mouradov y cols., 1998). La distribución de este *locus* en las gimnospermas apoya la monofilia de este grupo (Frohlich y Parker, 2000).

Los trabajos de evolución molecular de la clada de genes MADS-box (Purugannan y cols., 1995; Purugganan, 1997; Purugannan, 2000) han predicho que los tiempos de aparición de las subfamilias con funciones durante el desarrollo son más antiguos que la aparición de las estructuras morfológicas cuya ontogenia controlan. Esto supondría que los helechos, las briofitas y otros linajes vegetales también poseerían genes MADS-box con distintos grados de parentesco con los *loci* homeóticos florales. Esta expectativa se ha corroborado en ambos grupos de plantas terrestres (ver, por ejemplo, Münster y cols., 1997; Ashton y Krogan, 2000; Svensson y cols., 2000), e incluso ya se han encontrado representantes de la familia en algunos grupos de algas cercanamente relacionados a las primeras plantas terrestres: las carofitas (Tanabe y cols., 1999).

Otra contribución de nuestro laboratorio al estudio de la familia multigenética MADS-box en plantas está relacionada con la coopción de funciones para algunos de los genes MADS-box en *Arabidopsis*, enfatizando que no todos ellos son florales y homeóticos (Álvarez-Buylla y cols., 2000b). Recientemente encontramos que hay cladas de genes de esta familia que agrupan a *loci* que se expresan de manera específica o primordial en tejidos vegetativos. Al mapear los patrones de expresión sobre la filogenia de los genes MADS-box, nos dimos cuenta de que los genes ancestrales hipotéticos tenían patrones de expresión generalizados, los cuales evolucionaron hacia dominios espaciales de expresión más específicos, tanto en estructuras reproductivas como vegetativas. Los estudios preliminares de los genes que se expresan de manera primordial en raíz sugieren que éstos no tienen funciones homeóticas (Burgeff y cols., 2002). Aún nos queda un largo camino para entender a plenitud la función de estos genes MADS-box durante el desarrollo de la raíz.



Redes de regulación genética

Como hemos visto, el descubrimiento de los genes homeóticos ha ayudado enormemente en el entendimiento de la relación entre los genes, el desarrollo

ontogenético y la evolución de estructuras complejas en los organismos multicelulares. Tanto en animales como en plantas, las mutaciones homeóticas son fácilmente distinguibles en términos generales, y se han podido explicar con base en modelos sencillos de combinaciones de actividades de un puñado de genes, muchos de ellos pertenecientes únicamente a dos familias multigenéticas que codifican para factores de transcripción: los genes homeobox y los genes MADS-box. Sin embargo, análisis más profundos de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a los mismos mutantes homeóticos, así como a la amplia variedad de tamaños, formas y colores de los diferentes tipos de planes corporales y órganos que los constituyen, están demostrando consistentemente que hay muchos más genes e interacciones regulatorias involucrados en la morfogénesis de las estructuras complejas (Gerhart y Kirschner, 1997).

Tomemos como ejemplo la flor. Mutantes nulos de *AG*, que constituyen la función C en el modelo ABC expuesto en líneas anteriores, tienen restos de tejido carpelar; en ellos las mutaciones homeóticas no son totales. Esto indica que hay otros genes importantes en determinar la diferenciación en el cuarto verticilo de las flores. A pesar de su utilidad, los modelos genéticos clásicos que hemos revisado tienen limitaciones, porque son estáticos y no incorporan propuestas que integren los mecanismos e interacciones regulatorias dinámicas de los genes caracterizados hasta ahora. Por ejemplo, aunque se sabe qué mutaciones en *AG* son las responsables de anular, en gran medida, la función C, este gen cumple otras funciones, pues tiene interacciones regulatorias con muchos más genes. En base a la experiencia acumulada durante décadas de investigación empírica, es razonable estimar que el tiempo que tomaría llevar a cabo estudios detallados de todas estas interacciones adicionales podría ser demasiado largo como para que nuestra generación pudiera ver sus resultados. Entre otras, ésta es una fuerte razón por la que el interés por aplicar herramientas formales y computacionales que permitan hacer inferencias funcionales integrativas acerca de tales interacciones está creciendo a una gran velocidad. De hecho, esta inquietud generalizada alimenta de modo importante la empresa científica multinacional que se conoce como genómica comparativa —dentro de la cual se incluye, por supuesto, *Arabidopsis* (Riechmann y cols., 2000, The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000)— así como la puesta al día de la teoría de sistemas para los organismos modelo en la era molecular (ver, por ejemplo, Kitano, 2002).

La existencia de múltiples relaciones transcripcionales entre los genes tiene como consecuencia inmediata que la actividad transcripcional de uno o varios genes puede modificar la dinámica transcripcional de genes involucrados en más de una vía de regulación. Esta regulación cruzada entre distintos grupos de genes tiene como resultado el que la magnitud de una modificación genotípica no corresponda a la magnitud del cambio fenotípico asociado; en otras palabras, la relación genotipo-fenotipo se vuelve no lineal (ver, por ejemplo, Moreno, 1994). Traducido al contexto de la diferenciación celular, esto es equivalente a la antigua y paradójica observación de que, mientras que los organismos poseen diferentes tipos celulares, éstos son especificados a partir del mismo genotipo. ¿Cómo puede explicarse esto? Para entender el fenómeno, es importante explorar qué tipo de arquitec-

tura de interacciones podría permitir la aparición de los tipos de perfiles de actividades genéticas que caracterizan a cada uno de los diversos tipos celulares.

En la actualidad se reconoce que la arquitectura adecuada para resolver el problema anterior puede ser obtenida a partir de la modelación formal de las redes de regulación genética (ver, por ejemplo, Mjolsness y cols., 1991; Clarket y cols., 1993; Thieffry y cols., 1993; Zuckerkandl, 1994; Salazar-Ciudad y cols., 2001). En la naturaleza, dichas redes se establecen cuando los productos de algunos genes controlan la transcripción de otros genes, cuyos productos, a su vez, regulan la expresión de otros genes. Las redes de regulación, a diferencia de una "cascada" o una jerarquía, presentan además la posibilidad de retroalimentación, directa o indirecta. La retroalimentación funciona de manera análoga a lo que sucede en las rutas metabólicas, en donde la producción de un sustrato regula la tasa de su misma producción, o en los casos en que el producto de cierto gen puede regular indirectamente su propia transcripción.

Las redes de regulación genética se establecen cuando los productos de algunos genes controlan la transcripción de otros genes, cuyos productos, a su vez, regulan la expresión de otros genes.

Existe una vasta literatura sobre la constitución y propiedades de las redes formales que representarían a las redes genéticas reales. Uno de los teóricos más sobresalientes en el área es Stuart Kauffman, un médico interesado desde la década de 1970 en aplicar herramientas formales como el álgebra de Boole al hallazgo de restricciones estructurales a los modos en que ocurre el desarrollo embrionario en diferentes organismos. Curiosamente, su trabajo comenzó como una interpretación de los mismos mutantes homeóticos que analizaba García-Bellido (ver, por ejemplo, Kauffman, 1971, 1973, 1975, 1981 y 1987). A partir de sus contribuciones se han definido los rasgos fundamentales que las redes formales deben tener para aplicarse al estudio de la ontogenia y la citodiferenciación.

Las redes de regulación genética modeladas matemáticamente están constituidas por elementos (nodos) interconectados, y cada nodo tiene la capacidad de adquirir más de un estado de activación. El estado de activación de un nodo en particular es una función del estado de activación del conjunto de los nodos de los cuales recibe algún estímulo. No existen restricciones sobre el tipo de función que determina la activación de los nodos, pero por su simplicidad en muchas ocasiones se ha preferido la postulación de redes con elementos que sólo pueden adquirir dos estados de activación. Éstas son las llamadas redes booleanas en sentido estricto (Kauffman, 1993).

En la idealización de los genes como nodos en una red, la tasa de transcripción puede interpretarse como el estado de activación de los nodos. Al mismo tiempo, se puede proponer que los genes siempre se encuentran en uno de dos estados posibles: "apagados", es decir con una tasa transcripcional de cero, o "encendidos", con una tasa constante positiva de transcripción. La ventaja de modelar a grupos de genes como redes es que se puede aprovechar el amplio conocimiento que se tiene de las dinámicas de activación de los genes. Las redes son sistemas dinámicos que pueden adquirir diversos patrones de activación. Esto permite modelar a diferentes dinámicas de activación/inactivación de los nodos de una red como si ésta fuera genética. Dado que los diferentes tipos celulares de un mismo organismo pueden distinguirse morfológica y/o bioquímicamente (por lo cual es posible

identificar a cada tipo celular con un patrón particular de activación genética, aunque todos los tipos celulares compartan el mismo genotipo), si se modela al genoma de un organismo como una red constituida por todos los genes relevantes para un proceso dado —por ejemplo, la floración— y se identifica a cada estado de activación de la red como el patrón de expresión genética de algún tipo celular en particular, entonces la dinámica de activación de la red puede interpretarse como el proceso de diferenciación celular (Kauffman, 1993).

En la figura 5-5 damos un ejemplo sencillo de una red regulatoria. En ella existen dos genes —A y B— cada uno de los cuales tiene un umbral de activación —Ha y Hc, respectivamente. Si un gen es activado con un valor mayor a su umbral, este gen se activa y se transcribe. Las flechas representan las interacciones entre los genes, que pueden ser positivas (activaciones) o negativas (inhibiciones). En el ejemplo numérico se muestra que, si iniciamos la red prendiendo al gen A, éste activa a B con un valor de 2; como 2 >–1, B se activa. Luego, en virtud de la existencia de un asa de retroalimentación positiva de 1, B se queda prendido permanentemente. Esto resulta en una inhibición de A con valor de –2. Como este valor es menor a 1, que es el umbral de A, este último queda permanentemente apagado. En este ejemplo sencillo, el estado de la red en que A está apagado y encendido es un estado de activación estable que se conoce como atractor de punto fijo. Estos atractores representan los estados de activación estables característicos de distintos tipos celulares. Al conjunto de estados de activación iniciales que llevan a cada uno de los atractores, les

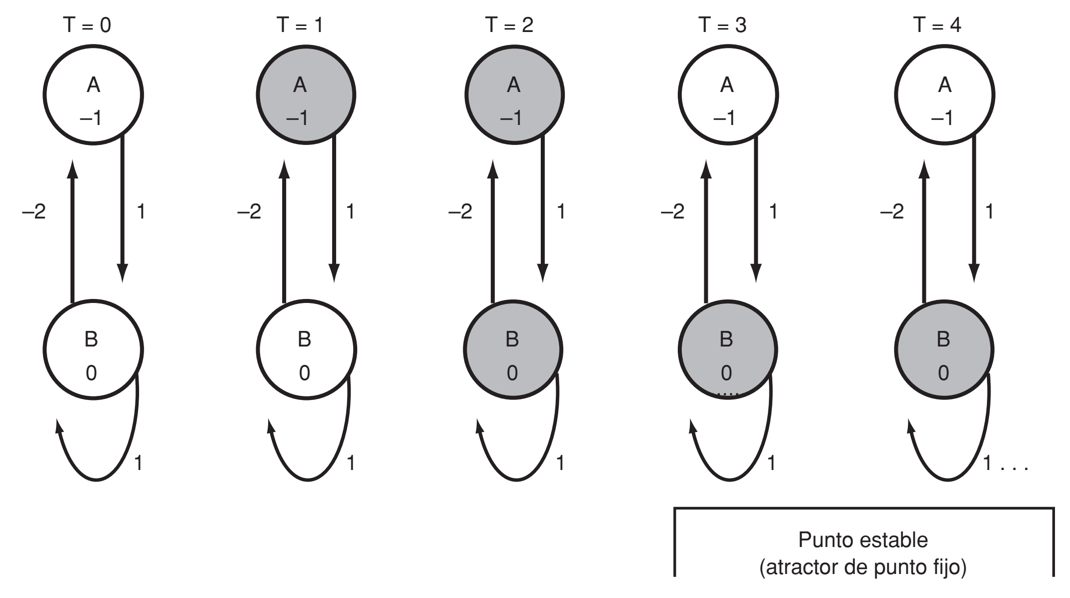


Figura 5-5. Dinámica de activación de una red booleana sencilla. Los círculos representan los nodos de la red que en el caso de redes de regulación genética representan genes y las líneas representan las interacciones entre los genes: las flechas son activaciones y las líneas romas son represiones. A partir del tiempo tres se llega a un estado de activación estable o atractor de punto fijo. Los distintos atractores de una red particular se interpretan como distintos tipos celulares. Ver texto para una explicación más detallada.

llamamos cuencas de atracción. Es cierto que las redes genéticas modelables con datos reales resultan mucho más complicadas que la sencilla red del ejemplo anterior, pero los principios para encontrar sus atractores de punto de fijo —que corresponden a los distintos tipos celulares— son los mismos.

Con la representación de los genes involucrados en la morfogénesis como redes de regulación, se abren nuevas perspectivas para el estudio de la relación genotipo-fenotipo. Como se ha hablado en otras partes de este capítulo, los genes homeóticos desempeñan un papel fundamental en la morfogénesis de muchas estructuras anatómicas. Por otra parte, se sabe que el origen de las familas de genes homeóticos (homeobox, MADS-box) provienen de múltiples duplicaciones genéticas. ¿Qué efecto tienen sobre la dinámica de activación genética la duplicación, o incluso la deleción, de miembros de una familia multigenética? ¿Qué efecto tienen sobre la morfogénesis esas mismas duplicaciones y deleciones? Utilizado el formalismo de redes para responder a la primera pregunta (Wagner, 1996), se ha encontrado que en ciertas condiciones la aparición o desaparición de grupos de genes no tiene efectos aparentes sobre la dinámica de activación. Este tipo de resultados no son obvios; las redes han sido posiblemente la herramienta más adecuada para atacarla.

En el laboratorio hemos utilizado la gran cantidad de resultados experimentales sobre la expresión de grupos de genes que intervienen en la morfogénesis floral para proponer un modelo de red que incluye a 11 de los genes de morfogénesis floral de *Arabidopsis* (Mendoza y Álvarez-Buylla, 1998; Mendoza y cols., 1999; figura 5-6). Dicho modelo, que plantea un enfoque mecanístico de los procesos de activación de genes involucrados en la morfogénesis floral, constituye la parte central de un modelo más general que describe y predice la morfología de plantas mutantes, así como su respuesta morfológica a los cambios del fotoperiodo en el que crecen las plantas. Es importante hacer notar que, aunque existen cerca de 60 proteínas con el motivo MADS, los 11 genes correspondientes que se utilizan en el modelo de red son todos aquellos que tienen un efecto reconocible sobre el fenotipo y la gran mayoría de ellos son genes homeóticos.

En nuestra interpretación, la flor de *Arabidopsis* equivale a un módulo fenotípico, al cual le corresponde otro módulo de carácter genotípico: la red de 11 genes. Hemos encontrado que la implementación de esta red predice seis estados estables; de manera notable, cuatro de ellos corresponden a los cuatro estados de activación del modelo ABC. El quinto estado corresponde a células que no están competentes para diferenciarse en células de meristemos florales, que correspondería a las células antes de la floración, mientras que el sexto estado de activación no se encuentra en plantas silvestres. Estos resultados apuntan a que estos modelos dinámicos pueden constituirse en herramientas útiles para integrar las funciones de los genes del desarrollo floral y postular hipótesis acerca de su evolución. Con análisis de simulaciones, también hemos visto que hay genes cuyos cambios tienen efectos en los estados estables predichos, mientras que hay otros genes que no afectan los estados estables de la red.

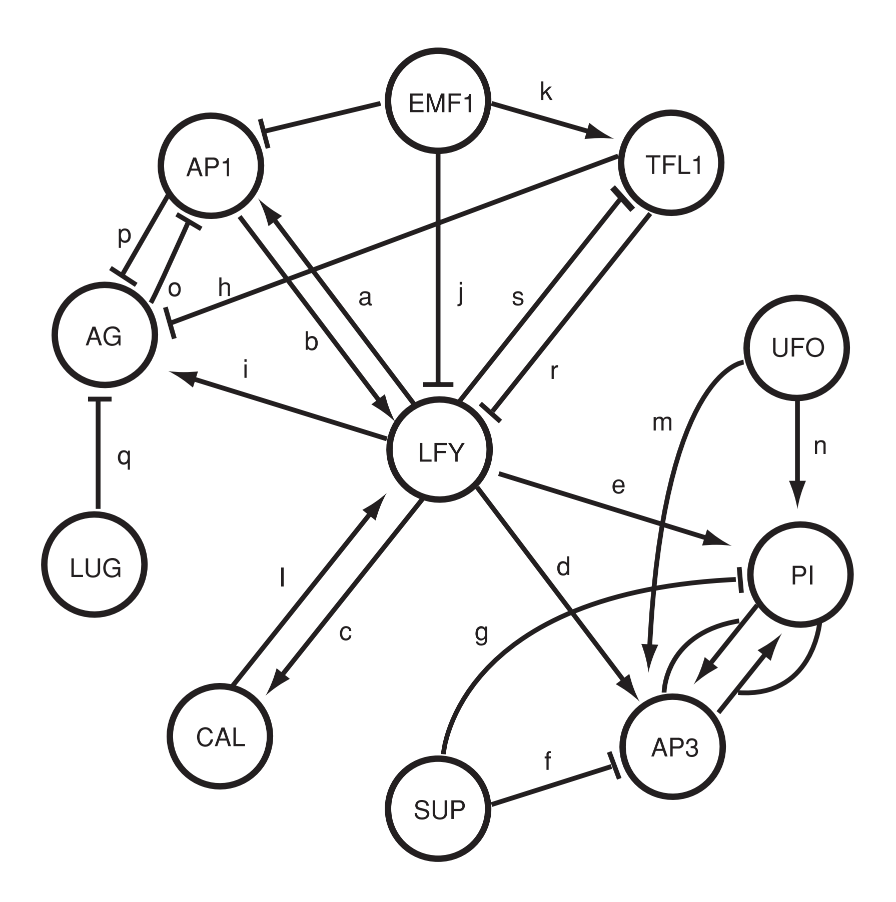


Figura 5-6. Red de regulación genética del desarrollo floral. Ver figura 5-5 y texto para una explicación más detallada.

Como una predicción derivada de lo anterior, esperamos que genes del primer grupo estén más restringidos funcionalmente que los segundos y, por lo tanto, suponemos que existirá mayor variación nucleotídica entre genes ortólogos aislados de diferentes especies del segundo grupo en comparación con genes del primer grupo.

Una de las consecuencias de más largo alcance de los resultados de la aplicación de los modelos dinámicos al estudio de la morfogénesis y la diferenciación celular es el hecho de que cualquier gen particular no es el responsable solitario del desarrollo de una estructura o complejo. En contraste, los modelos sugieren que lo que ocurre en la naturaleza es la generación de estados de activación estables como resultado del comportamiento dinámico de redes de interacciones genéticas complejas (Goodwin y cols., 1993). Pero, entonces, ¿hasta dónde importan los genes y su naturaleza molecular? ¿Cuál es la importancia de los enfoques holísticos en biología? Sin duda, en los próximos años presenciaremos grandes avances experimentales, teóricos y computacionales que nos acerquen a comprender mejor los complejos sistemas biológicos y sus alteraciones. Más allá de la comprensión básica, este avance repercutirá en aplicaciones que provean con una mayor capacidad para prevenir y curar enfermedades y —esperamos— también en la prevención de la destrucción de las especies en los ambientes naturales.



Conclusión: las plantas y animales como elaboraciones naturales independientes del desarrollo ontogenético y la diferenciación celular

Como hemos visto a lo largo de este capítulo, el estudio de los mecanismos de desarrollo de las plantas con una perspectiva genético-molecular, embriológica y principalmente evolutiva nos permitirá hacer comparaciones con lo encontrado en sistemas animales. El enfoque comparativo es imprescindible para poder responder a preguntas básicas de la biología. Por ejemplo, ¿puede el desarrollo multicelular evolucionar de nuevo? ¿Cuántas veces lo ha hecho? ¿Son las bases moleculares del desarrollo en plantas y animales diferentes o comunes? ¿Cuáles aspectos del desarrollo de plantas y animales son comunes y cuáles son diferentes? (Meyerowitz, 1997). Si partimos de la base de que ambos linajes se originaron de un ancestro unicelular común, pero que en el camino evolutivo a la multicelularidad en ambos linajes hubo una larga historia independiente de unicelulares y multicelulares con diferentes grados de complejidad, uno supondría que los mecanismos de regulación a nivel celular sean comunes, pero que los mecanismos de interacción entre células sean diferentes. En realidad, esto es lo que se encuentra cuando se comparan plantas y animales (Meyerowitz, 2002).

La respuesta a estas preguntas revelará aspectos importantes de la lógica del desarrollo como un fenómeno biológico general e indicaría los tipos de restricciones que ha habido en la evolución de los mecanismos de desarrollo en los grandes grupos de multicelulares de la Tierra, muy probablemente determinada históricamente por su origen común. Si tal lógica puede ser dilucidada con el formalismo de redes, como hemos argumentado, y al mismo tiempo los episodios evolutivos únicos pueden ser identificados con las técnicas actuales de la sistemática, la suma de este conocimiento a lo que ahora sabemos sobre el control genético de la morfogénesis con seguridad permitirá realizar una nueva síntesis evolutiva en la cual, además de comprender las fuerzas que actúan sobre la variación, entendamos cabalmente la naturaleza misma de ella y las razones de su origen.



Referencias bibliográficas

Abouheif, E.; Akam, M.; Dickinson, W.J.; Holland, P.W.; Meyer. A.; Patel, N.H.; Raff, R.A.; Roth, V.L. y Wray, G.A., "Homology and developmental genes", *TRENDS GENET,* **13:** 432-433, 1997.

Adams, M.D.; Celniker, S.E.; Holt, R.A.; Evans, C.A.; Gocayne, J.D.; Amanatides, P.G.; Scherer, S.E.; Li, P.W.; Hoskins, R.A.; Galle, R.F.; George, R.A.; Lewis. S.E.; Richards, S.; Ashburner, M.; Henderson, S.N.; Sutton, G.G.; Wortman, J.R.; Yandell, M.D.; Zhang, Q.; Chen, L.X.; Brandon, R.C.; Rogers, Y.H.; Blazej. R.G.; Champe, M.; Pfeiffer, B.D.; Wan, K.H.; Doyle, C.; Baxter, E.G.; Helt, G.; Nelson, C.R.; Gabor, G.L.; Abril, J.F.; Agbayani, A.; An, H.J.; Andrews-Pfannkoch, C.;

Baldwin, D.; Ballew, R.M.; Basu, A.; Baxendale, J.; Bayraktaroglu, L.; Beasley, E.M.; Beeson, K.Y.; Benos, P.V.; Berman, B.P.; Bhandari, D.; Bolshakov, S.; Borkova, D.; Botchan, M.R.; Bouck, J.; Brokstein, P.; Brottier, P.; Burtis, K.C.; Busam, D.A.; Butler, H.; Cadieu, E.; Center, A.; Chandra, I.; Cherry, J.M.; Cawley, S.; Dahlke, C.; Davenport, L.B.; Davies, P.; De Pablos, B.; Delcher, A.; Deng, Z.; Mays, A.D.; Dew, I.; Dietz, S.M.; Dodson, K.; Doup, L.E.; Downes, M.; Dugan-Rocha, S.; Dunkov, B.C.; Dunn, P.; Durbin, K.J.; Evangelista, C.C.; Ferraz, C.; Ferriera, S.; Fleischmann, W.; Fosler, C.; Gabrielian, A.E.; Garg, N.S.; Gelbart, W.M.; Glasser, K.; Glodek, A.; Gong, F.; Gorrell, J.H.; Gu, Z.; Guan, P.; Harris, M.; Harris, N.L.; Harvey, D.; Heiman, T.J.; Hernández, J.R.; Houck, J.; Hostin, D.; Houston, K.A.; Howland, T.J.; Wei, M.H.; Ibegwam, C.; Jalali, M.; Kalush, F.; Karpen, G.H.; Ke, Z.; Kennison, J.A.; Ketchum, K.A.; Kimmel, B.E.; Kodira, C.D.; Kraft, C.; Kravitz, S.; Kulp, D.; Lai, Z.; Lasko, P.; Lei, Y.; Levitsky, A.A.; Li, J.; Li, Z.; Liang, Y.; Lin, X.; Liu, X.; Mattei, B.; McIntosh. T.C.; McLeod, M.P.; McPherson, D.; Merkulov, G.; Milshina, N.V.; Mobarry, C.; Morris, J.; Moshrefi, A.; Mount, S.M.; Moy, M.; Murphy, B.; Murphy, L.; Muzny, D.M.; Nelson, D.L.; Nelson, D.R.; Nelson, K.A.; Nixon, K.; Nusskern, D.R.; Pacleb, J.M.; Palazzolo, M.; Pittman, G.S.; Pan, S.; Pollard, J.; Puri, V.; Reese, M.G.; Reinert, K.; Remington, K.; Saunders, R.D.; Scheeler, F.; Shen, H.; Shue, B.C.; Siden-Kiamos, I.; Simpson, M.; Skupski, M.P.; Smith, T.; Spier, E.; Spradling, A.C.; Stapleton, M.; Strong, R.; Sun, E.; Svirskas, R.; Tector, C.; Turner, R.; Venter, E.; Wang, A.H.; Wang, X.; Wang, Z.Y.; Wassarman, D.A.; Weinstock, G.M.; Weissenbach, J.; Williams, S.M.; Woodage, T.; Worley, KC.; Wu, D.; Yang, S.; Yao, Q.A.; Ye, J.; Yeh, R.F.; Zaveri, J.S.; Zhan, M.; Zhang, G.; Zhao, Q.; Zheng, L.; Zheng, X.H.; Zhong, F.N.; Zhong, W.; Zhou, X.; Zhu, S.; Zhu, X.; Smith, H.O.; Gibbs, R.A.; Myers, E.W.; Rubin, G.M. y Venter, J C., "The genome sequence of *Drosophila melanogaster", Science,* **287:** 2185-2195, 2000.

Adoutte, A.; Balavoine, G.; Lartillot, N.; Lespinet, O.; Prud'homme, B. y De Rosa, R., "The new animal phylogeny: reliability and implications", *PNAS,* EE.UU.*,* **97:** 4453-4456, 2000.

Álvarez-Buylla, E.R., "La diversidad de las formas vegetales: variaciones sobre un mismo tema", *Ciencias,* **65:** 19-28, 2002.

———— ; Liljegren, S.J.; Pelaz, S.; Gold, S.E.; Burgeff, C.; Ditta, G.S.; Vergara-Silva, F. y Yanofsky, M.F., "MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes", *Plant J.,* **24:** 457-466, 2000b.

———— ; Pelaz, S.; Liljegren, S.J.; Gold, S.E.; Burgeff, C.; Ditta, G.S.; Ribas de Pouplana, L.; Martínez-Castilla, L. y Yanofsky, M.F., "An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals", *PNAS,* EE.UU. **97:** 5328-5333, 2000a.

Ambrose, B.A.; Lerner, D.R.; Ciceri, P.; Padilla, C.M.; Yanofsky, M. y Schmidt, R., "Molecular and genetic analyses of the *SILKY1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots", *Mol. Cell,* **5:** 569-579, 2000.

Amores, A.; Force, A.; Yan, Y.L.; Joly, L.; Amemiya, C.; Fritz, A.; Ho, R.K.; Langeland, J.; Prince, V.; Wang, Y.L.; Westerfield, M.; Ekker, M. y Postlethwait, J.H., "Zebrafish *Hox* clusters and vertebrate genome evolution", *Science,* **282:** 1711-1714, 1998.

Angenent, G.C.; Busscher, M.; Franken, J.; Mol, J.N. y Van Tunen, A.J., "Differential expression of two MADS box genes in wild-type and mutant petunia flowers", *Plant Cell,* **4:** 983-993, 1992.

Arendt, D. y Wittbrodt, J., "Reconstructing the eyes of Urbilateria", *Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.,* **356**: 1545-1563, 2001.

Arnone, M.I. y Davidson, E.H., "The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems", *Development,* **124:** 1851-1864, 1997.

Arthur, W., "The emerging conceptual framework of evolutionary developmental biology", *Nature,* **415:** 757-764, 2002.

Bailey, W.J.; Kim, J.; Wagner, G.P. y Ruddle, F.H., "Phylogenetic reconstruction of vertebrate *Hox* cluster duplications", *Mol. Biol. Evol.,* **14:** 843-853, 1997.

Bateson, W., *Materials for the Study of Variation,* Johns Hopkins University Press, EE.UU., 1894, reimp. 1992.

Bender, W.; Akam, M.; Karch, F.; Beachy, P.A.; Peifer, M.; Spierer, P.; Lewis, E.B. y Hogness, D.S., "Molecular genetics of the *bithorax* complex in *Drosophila melanogaster", Science,* **221:** 23-29, 1983.

Benfey, P.N. y Weigel, D., "Transcriptional networks controlling plant development", *Plant Physiol.,* **125:** 109-111, 2001.

Billeter, M.; Qian, Y.Q.; Otting, G.; Muller, M.; Gehring, W., y cols., "Determination of the nuclear magnetic resonance solution structure of an Antennapedia homeodomain-DNA complex", *J. Mol. Biol.,* **234:** 1084-1094, 1993.

Blázquez, M.A., "Flower development pathways", *J. Cell Sci.,* **113:** 3547-3548, 2000.

Bouhidel, K. e Irish, V.F., "Cellular interactions mediated by the homeotic *PISTILLATA* gene determine cell fate in the *Arabidopsis* flower", *Dev. Biol.,* **174:** 22-31, 1996.

Britten, R.J. y Davidson, E.H., "Gene regulation for higher cells: a theory", *Science,* **165:** 349-357, 1969.

Brooke, N.M.; García-Fernández, J. y Holland, P.W.H., "The *ParaHox* gene cluster is an evolutionary sister of the *Hox* gene cluster", *Nature,* **392:** 929-922, 1998.

Brown, S.J.; Mahaffey, J.P.; Lorenzen, M.D.; Denell, R.E. y Mahaffey, J.W., "Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects", *Evol. Dev.,* **1:** 11-15, 1999.

Buckingham, M., "Molecular biology of muscle development", *Cell,* **78:** 15-21, 1994.

Burgeff, C.; Liljegren, S.J.; Tapia-López, R.; Yanofsky, M.F. y Álvarez-Buylla, E.R., "MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots", *Planta,* **214:** 365-72, 2002.

Bürglin, T.R., "A comprehensive classification of homeobox genes", en *Guide to the* Homeobox *Genes,* Duboule D. eds., Oxford University Press, Inglaterra, 1994.

———, 2001. http://www.biosci.ki.se/groups/tbu/homeo.html.

Capdevila, J. e Izpisúa-Belmonte, J.C., "Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development", *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.,* **17:** 87-132, 2001.

Carpenter, R.L.; Copsey, C.; Vincent, S.; Doyle, R.; Magrath y Coen, E., "Control of flower development and phyllotaxy by meristem identity genes in *Antirrhinum", Plant Cell,* 2001-2011, 1995.

Carrasco, A.E.; McGinnis, W.; Gehring, W.J. y De Robertis, E.M., "Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes", *Cell,* **37:** 409-414, 1984.

Carroll, S.B., "Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates", *Nature,* **376:** 479-485, 1995.

———; Grenier, J.K. y Weatherbee, S.D., "From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design", *Blackwell Science*, EE.UU., 2001.

Chaw, S.M.; Parkinson, C.L.; Cheng, Y.; Vincent, T.M. y Palmer, J.D., "Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers", *PNAS,* EE.UU., **97:** 4086-4091, 2000.

Chung, Y.Y.; Kim, S.R.; Finkel, D.; Yanofsky, M.F. y An G., "Early flowering and reduced apical dominance result from ectopic expression of a rice MADS box gene", *Plant Mol. Biol.,* **26:** 657-665, 1994.

Clark, S.E.; Williams, R.W. y Meyerowitz, E.M., "The *CLAVATA 1* gene encodes a putative receptor protein kinase that controls shoot and flower meristem size in *Arabidopsis", Cell,* **89:** 575-585, 1997.

Clarket, B.; Mittenthal, J.E. y Senn, M., "A model for the evolution of networks of genes", *J. Theor. Biol.,* **165:** 269-289, 1993.

Coen, E.S. y Meyerowitz, E.M., "The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development", *Nature,* **353:** 31-37, 1991.

Coupland, G., "Genetic and environmental control of flowering time in *Arabidopsis", Trends Genet.,* **11:** 393-397, 1995.

Crepet, W.L., "The abominable mystery", *Science,* **282:** 1653-1654, 1998.

Cronk, Q.C.B., "Plant evolution and development in a post-genomic context", *Nat. Rev. Genet.,* **2:** 607-619, 2001.

Davidson, E.H., *Genomic Regulatory Systems. Development and Evolution,* Academic Press, EE.UU., 2001.

———— ; Rast, J.P.; Oliveri, P.; Ransick, A.; Calestani, C.; Yuh, C.H.; Minokawa, T.; Amore, G.; Hinman, V.; Arenas-Mena, C.; Otim, O.; Brown, C.T.; Livi, C.B.; Lee, P.Y.; Revilla, R.; Rust, A.G.; Pan, Z.; Schilstra, M.J.; Clarke, P.J.; Arnone, M.I.; Rowen, L.; Cameron, R.A.; McClay, D,R.; Hood, L. y Bolouri, H., "A genomic regulatory network for development", *Science,* **295:** 1669-1678, 2002.

———— y Britten, R.J. "Note on the control of gene expression during development", *J. Theor. Biol.,* **32:** 123-130, 1971.

Davies, B.; Egea-Cortines, M.; De Andrade Silva, E.; Saedler, H. y Sommer, H., "Multiple interactions amongst floral homeotic MADS-box proteins", *EMBO J.,* **15:** 4330-4343, 1996.

De Robertis, E.M., "The homeobox in cell differentiation and evolution", en Duboule D., eds., *Guide to the Homeo*box *Genes.* Oxford University Press, Inglaterra, 1994.

De Rosa R.; Grenier, J.K.; Andreeva, T.; Cook, C.E.; Adoutte A.; Akam, M.; Carroll, S.B. y Balavoine, G., "*Hox* genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution", *Nature,* **399:** 772-776, 1999.

Dietrich, M.R., "Macromutation", en Keller EF, Lloyd EA, eds., *Keywords in Evolutionary Biology*, Princeton University Press, EE.UU., 1992.

————, "Richard Goldschmidt's`heresies´ and the evolutionary synthesis". *J. Hist. Biol.,* **28:** 431-461, 1995.

———— "From gene to genetic hierarchy: Richard Goldschmidt and the problem of the gene", en Beurton, P.J.; Falk R. y Rheinberger, H.J., eds., *The Concept of the Gene in Development and Evolution. Historical and epistemological perspectives,* Cambridge University Press, EE.UU., 2000a.

————, "From hopeful monsters to homeotic effects: Richard Goldschmidt's integration of development, evolution and genetics", *Amer. Zool.,* **40:** 738-747, 2000b.

Dobzhansky, T., *Genetics and the Origin of Species,* Columbia University Press, EE.UU., 1937.

———— ; Ayala, F.J.; Stebbins, G.L. y Valentine, J.W., *Evolution*, Freeman, EE.UU., 1977.

Draganescu, A. y Tullius, T.D., "The DNA binding specificity of engrailed homeodomain", *J. Mol. Biol.,* **276:** 529-536, 1998.

Dubois, E. y Messenguy, F., "*In vitro* studies of the binding of the ARGR proteins to the ARG5,6 promoter", *Mol. Cell Biol.,* **11:** 2162-2168, 1991.

Duboule D., ed., *Guide to the Homeobox Genes*. Oxford University Press, Inglaterra, 1994.

Egea-Cortines, M., Saedler H. y Sommer H. "Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in Antirrhinum majus", *EMBO J.* **18:** 5370-5379, 1999.

Erwin, D.; Valentine, J. y Jablonsky, D., "The origin of animal body plans", *Amer. Sci.,* **85:** 126-137, 1997.

Ferrier, D.E.K.; Minguillón, C.; Holland, P.W.H. y García-Fernández, J., "The amphioxus *Hox* cluster: deuterostome posterior flexibility and Hox14", *Evol. Dev.,* **2:** 284-293, 2000.

———— y Holland, P.W.H., "Ancient origin of the *Hox* gene cluster", *Nat. Rev. Genet.,* **2:** 33-38, 2001

Finnerty, J.R. y Martindale, M.Q., "The evolution of the *Hox* cluster: insights from outgroups", *Curr. Opin. Genet. Dev.,* **8:** 681-687, 1998.

———— , "Ancient origins of axial patterning genes: *Hox* genes and *ParaHox* genes in the Cnidaria", *Evol. Dev.,* **1:** 16-23, 1999.

Fowler, S.; Lee, K.; Onouchi, H.; Samach, A.; Richardson, K.; Morris, B.; Coupland, G. y Putterill, J., "*GIGANTEA*: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains", *EMBO J.,* **18:** 4679-4688, 1999.

Fraenkel, Pabo, C.O., "Comparison of X-ray and NMR structures for the Antennapedia homeodomain-DNA complex", *Nat. Struct. Biol.,* **5:** 692-697, 1998.

Frohlich, M. y Parker, D.S., "The mostly male theory of flower evolutionary origins: from genes to fossils", *Syst. Bot.,* **25:** 155-170, 2000.

Gamboa, A.; Paez-Valencia, J.; Acevedo, G.F.; Vázquez-Moreno, L. y Álvarez-Buylla, R.E., "Floral transcription factor AGAMOUS interacts in vitro with a leucine-rich repeat and an acid phosphatase protein complex", *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **288:** 1018-1026, 2001.

García-Bellido, A., "Cell affinities in antennal homoeotic mutants of Drosophila melanogaster", *Genetics,* **59:** 487-499, 1968.

———— , "Genetic control of wing disc development in *Drosophila*", *Ciba Found. Symp.,* **29:** 161-182, 1975.

———— 1978, "The *bithorax* syntagma", en Lakovaara, S., ed., *Advances in Genetics, Development, and Evolution of Drosophila, VII European Drosophila Research Conference*, Plenum Press, EE.UU.

———— , "Genetic analysis of morphogenesis", en Gustafson, P.; Stebbins, G.L. y Ayala, F., eds., *Genetics, Development and Evolution,* Plenum Press, EE.UU., 1984.

———— , "The *engrailed* story", *Genetics,* **148:** 539-544, 1998.

———— ; Lawrence, P.A. y Morata, G., "Compartments in animal development", *Sci. Amer.,* **241:** 102-110, 1979.

———— ; Morata, G. y Ripoll, P., "Developmental compartmentalization of the wing disc of *Drosophila", Nature New Biol.,* **245:** 251-253, 1973.

——— y Lewis, E.B., "Autonomous cellular differentiation of homoeotic bithorax mutants of *Drosophila melanogaster", Dev. Biol.,* **48:** 400-410, 1976.

Gauchat, D.; Mazet, F.; Berney, C.; Schummer, M.; Kreger, S.; Pawlowski, J. y Galliot, B., "Evolution of Antp-class genes and differential expression of Hydra *Hox/ParaHox* genes in anterior patterning", *PNAS,* EE.UU., **97:** 4493-4498, 2000.

Gehring, W., "The homeobox: a key to the understanding of development?", *Cell,* **40:** 3-5, 1985.

———, "The homeobox in perspective", *Trends Bioch. Sci.,* **17:** 277-280, 1992.

———, "A history of the homeobox*",* en Duboule D., ed., *Guide to the Homeobox Genes,* Oxford University Press, Inglaterra, 1994.

———; Affolter, M. y Burglin, T., "Homeodomain proteins", *Ann. Rev. Biochem.,* **63:** 487-526, 1994.

——— e Ikeo, K., "*Pax6*: mastering eye morphogenesis and eye evolution", *Trends Genet*., **15:** 371-377, 1999.

Gellon, G. y McGinnis, W., "Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of *Hox* expression patterns", *Bioessays,* **20:** 116-25, 1998.

Gerhart, J. y Kirschner, M., *Cells, Embryos, and Evolution*, Blackwell Science, Inglaterra, 1997.

Gibson, G. y Wagner, G., "Canalization in evolutionary genetics: a stabilizing theory?", *BioEssays,* **22:** 372-380, 2000.

Gilbert, S.F., *Developmental Biology,* 2a. ed., Sinauer, EE.UU., 1988.

———, *Developmental Biology*, 6a. ed., Sinauer, EE.UU., 2000.

———; Opitz, J.M. y Raff, R.A., "Resynthesizing evolutionary and developmental biology", *Dev. Biol.,* **173:** 357-372, 1996.

Glardon, S.; Holland, L.Z.; Gehring, W.J. y Holland, N.D., "Isolation and developmental expression of the amphioxus *Pax-6* gene (*AmphiPax-6*): insights into eye and photoreceptor evolution", *Development,* **125:** 2701-2710, 1998.

Goldschmidt, R., *Physiological Genetics*, McGraw-Hill, EE.UU., 1938

———, *The Material Basis of Evolution,* Yale University Press, EE.UU., 1940.

Goldschmidt, R.B.; Hannah, A. y Piternick, L.K., "The *podoptera* effect in *Drosophila melanogaster", Univ. Calif. Publ. Zool.,* **55:** 67-294, 1951.

Goodwin, B.C.; Kauffman, S. y Murray, J.D., "Is morphogenesis an intrinsically robust process?", *J. Theor. Biol.,* **163:** 135-144, 1993.

Goto, K. y Meyerowitz, E.M., "Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene PISTILLATA", *Genes Dev.,* **8:** 1548-1560, 1994.

Gould, S.J., "The hardening of the Modern Synthesis" en Grene, M. ed., *Dimensions of Darwinism*, Cambridge University Press, EE.UU., 1983.

Graba, Y.; Aragnol, D. y Pradel, J., "*Drosophila Hox* complex downstream targets and the funtion of the homeotic genes", *BioEssays,* **19:** 379-388, 1997.

Gross, C.T. y McGinnis, W.J., "The function of homeodomain proteins in *Drosophila* development", en Goodbourn, S., ed., *Eukaryotic Gene Transcription,* Oxford University Press, Inglaterra, 1996.

Gutiérrez-Cortines, M. y Davies B., "Beyond the ABC's: ternary complex formation in the control of floral organ identity", *Trends Plant Sci.,* **5:** 471-476, 2000.

Hadorn, E., "Transdetermination in cells", *Sci. Amer.,* **219:** 110-120, 1968.

Halder, G.; Callaerts, P. y Gehring, W.J., "Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*", *Science,* **267:** 1788-1792, 1995.

Herskowitz, I., "A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast", *Nature,* **342:** 749-757, 1989.

Hirsch, J.A. y Aggarwal, A.K., "Structure of even-skipped homeodomain complexed to AT rich DNA: new perspectives on homeodomain specificity", *EMBO J.,* **14:** 6280-6291, 1995.

Holland, P.W.H. y García-Fernández, J., "*Hox* genes and chordate evolution", *Dev. Biol.,* **173:** 382-395, 1996.

Honma, T. y Goto, K., "Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs", *Nature,* **409:** 525-529, 2001.

Huang, H.; Tudor, M.; Weiss, C.A.; Hu, Y. y Ma, H., "The *Arabidopsis* MADS-box gene AGL3 is widely expressed and encodes a sequence-specific DNA-binding protein", *Plant Mol. Biol.,* **28:** 549-567, 1995.

Immink, R.G.; Gadella, T.W. Jr.; Ferrario, S.; Busscher, M. y Angenent, G.C., "Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells", *PNAS,* EE.UU., **99:** 2416-2421, 2002.

———— ; Hannapel, D.J.; Ferrario, S.; Busscher, M.; Franken, J.; Lookeren Campagne, M.M. y Angenent, G.C., "A petunia MADS box gene involved in the transition from vegetative to reproductive development", *Development,* **126:** 5117-5126, 1999.

Ingham, P.W., "The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*", *Nature,* **335:** 25-34, 1988.

Irvine, K.D. y Rauskolb, C., "Boundaries in development: formation and function", *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.,* **17:** 189-214, 2001.

Jack, T.; Brockman, L.L. y Meyerowitz, E.M., "The homeotic gene APETALA3 of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS-box and is expressed in petals and stamens. *Cell,* **68:** 683-697, 1992.

———— ; Fox, G.L. y Meyerowitz, E.M., "*Arabidopsis* homeotic gene APETALA3 ectopic expression; transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity", *Cell,* **76:** 703-716, 1994.

Jarvis, E.E.; Clark, K.L. y Sprague, G.F. "The yeast transcription activator PRTF, a homolog of the mammalian serum response factor, is encoded by the MCM1 gene", *Genes Dev.,* **3:** 936-945, 1989.

Kang, S.G. y Hannapel, D.J., "Nucleotide sequences of novel potato (*Solanum tuberosum* L.) MADS-box cDNAs and their expression in vegetative organs", *Gene,* **166:** 329-330, 1995.

Kappen, C., "Analysis of a complete homeobox gene repertoire: implications for the evolution of diversity", *PNAS, EE-UU.,* **97:** 4481-4486, 2000.

Kauffman, S., "Gene regulation networks: a theory for their global structure and behaviors", *Curr. Top. Dev. Biol.,* **6:** 145-182, 1971.

————, "Control circuits for determination and transdetermination", *Science,* **181:** 310-318, 1973.

————, "Control circuits for determination and transdetermination: interpreting positional information in a binary epigenetic code", *Ciba Found. Symp.,* **29:** 201-221, 1975.

————, "Pattern formation in the *Drosophila* embryo", *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.,* **295:** 567-594, 1981.

————, "Developmental logic and its evolution", *BioEssays,* **6:** 82-87, 1987.

————, *The Origins of Order. Self-organization and selection in evolution,* Oxford University Press, EE.UU., 1993.

Kauffman, T.C.; Lewis, R. y Wakimoto, B., "Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: the homeotic gene complex in polytene chromosome interval 84A-B", *Genetics,* **94:** 115-133, 1980.

Kenyon, C., "If birds can fly, why can't we? Homeotic genes and evolution", *Cell,* **78:** 175-180, 1994.

Kissinger, C.R.; Liu, B.S.; Martinblanco, E.; Kornberg, T.B. y Pabo, C.O., "Crystal-structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution a framework for understanding homeodomain-DNA interactions", *Cell,* **63** (3)**:** 579-590, 1990.

Kitano, H., "Systems biology: a brief overview", *Science,* **295:** 1662-1664, 2002.

Klemm, J.D.; Rould, M.A.; Aurora, R.; Herr, W. y Pabo, C.O., "Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA binding modules", *Cell,* **77:** 21-32, 1994.

Knoll, A.H. y Carroll, S.B., "Early animal evolution: emerging views from comparative biology and geology", *Science,* **284:** 2129-2137, 1999.

Kramer, E.M.; Dorit, R.L. e Irish, V.F., "Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: duplication and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineages", *Genetics,* **149:** 765-783, 1998.

——— e Irish, V.F., "Evolution of genetic mechanisms controlling petal development", *Nature,* **399:** 144-148, 1999.

Krizek, B.A. y Meyerowitz, E.M., "Mapping the protein regions responsible for the functional specificities of the *Arabidopsis* MADS domain organ-identity proteins", *PNAS,* EE.UU., **93:** 4063-4070, 1996.

Krogan, N.T. y Ashton, N.W., "Ancestry of MADS-box genes revealed by bryophyte (*Physcomitrella patens*) homologues", *New Phytol.,* **147:** 505-517, 2000.

Laughon, A., "DNA binding specificity of homeodomains", *Biochemistry,* **30:** 11357-11367, 1991.

——— y Scott, M.P., "Sequence of a *Drosophila* segmentation gene: protein structure homology with DNA-binding proteins", *Nature,* **310:** 25-31, 1984.

Lawrence, P.A., *The Making of a Fly: the Genetics of Animal Design,* Blackwell Science, Inglaterra, 1992.

——— y Struhl, G., "Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *Drosophila*?", *Cell,* **85:** 951-961, 1996.

Levin, J.Z. y Meyerowitz, E.M., "UFO: An *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development", *Plant Cell,* **7:** 529-548, 1995.

Lewis, E.B., "Genes and developmental pathways", *Amer. Zool.,* **3:** 33-56, 1963.

———, "A gene complex controlling segmentation in *Drosophila", Nature,* **276:** 565-570, 1978.

———, "The *bithorax* complex: the first fifty years", *Int. J. Dev. Biol.,* **42:** 403-415, 1998.

Li, T.; Stark, M.R.; Johnson, A.D. y Wolberger, C., "Crystal structure of the Mat-a1/mat alpha-2 homeodomain heterodimer bound to DNA", *Science,* **270** (5234)**:** 262-269, 1995.

Liu, Z. y Meyerowitz, E.M., "*LEUNIG* regulates *AGAMOUS* expression in Arabidopsis flowers", *Development,* **121:** 975-991, 1995.

Loosli, F.; Kmita-Cunisse, M. y Gehring, W.J., "Isolation of a *Pax6* homolog from the ribbonworm *Lineus sanguineus", PNAS,* EE.UU., **93:** 2658-2663, 1996.

Ma, H.; Yanofsky, M.F. y Meyerowitz, E.M., "*AGL1-AGL6,* an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes", *Genes Dev.,* **5:** 484-495.

Mandel, M.A.; Gustafson-Brown, C.; Savidge, B. y Yanofsky, M.F., "Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene *APETALA1", Nature,* **360:** 273-277, 1992.

Mandel, T.; Lutziger, I. y Kuhlemeier, C., "A ubiquitously expressed MADS-box gene from *Nicotiana tabacum*", *Plant Mol. Biol.,* **25:** 319-321, 1994.

Mann, R.S., "Why are *Hox* genes clustered?", *BioEssays,* **19:** 661-664, 1997.
Martindale, M.Q. y Kourakis, M.J., "*Hox* clusters: size doesn't matter", *Nature,* **399:** 730-731, 1999.
Mayr, E., *Systematics and the Origin of Species*, Columbia University Press, EE.UU., 1942.
———, "Goldschmidt and the evolutionary synthesis: a response", *J. Hist. Biol.,* **30:** 31-33, 1997.
McGinnis, W., "A century of homeosis, a decade of homeoboxes", *Genetics,* **137:** 607-611, 1994.
———; Garber, R.L.; Wirz, J., Kuroiwa, A. y Gehring, W.J., "A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans", *Cell,* **37** (2)**:** 403-408, 1984.
——— y Krumlauf, R., "*Homeobox* genes and axial patterning", *Cell,* **68:** 283-302, 1992.
Mendoza, L.; Thieffry, D. y Álvarez-Buylla, E.R., "Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical analysis", *Bioinformatics,* **15:** 593-606, 1999.
——— y Álvarez-Buylla, E.R., "Dynamics of the genetic regulatory network for Arabidopsis thaliana flower morphogenesis", *J. Theor. Biol.,* **193:** 307-319, 1998.
——— y Álvarez-Buylla, E.R., "Genetic regulation of root hair development in Arabidopsis thaliana: a network model", *J. Theor. Biol.,* **204:** 311-326, 2000.
Meyerowitz, E.M., "The genetics of flower development", *Sci. Am.,* **271:** 40-47, 1994.
———, "Plants compared to animals: the broadest comparative study of development", *Science,* **295:** 1482-1485, 2002.
Mjolsness, E.; Sharp, D.H. y Reinitz, J., "A connectionist model of development", *J. Theor. Biol.,* **152:** 429-453, 1991.
Morgan, B.A. y Tabin, C.J., "The role of homeobox genes in limb development", *Curr. Opin. Genet. Dev.,* **3:** 668-674, 1993.
Mouradov, A.; Glassick, T.; Hamdorf, B.; Murphy, L.; Fowler, B.; Marla, S. y Teasdale, R.D., "*NEEDLY,* a *Pinus radiata* ortholog of *FLORICAULA/LEAFY* genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems", *Proc. Natl. Acad. Sci,* EE.UU., **95:** 6537-6542, 1998.
Mueller, C.G.F. y Nordheim, A., "A protein domain conserved between yeast MCM1 and human SRF directs ternary complex formation", *EMBO J.,* **11:** 3011-3019, 1991.
Münster, T.; Pahnke, J.; Di Rosa, A.; Kim, J.T.; Martin, W.; Saedler, H. y Theissen, G., "Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants", *PNAS,* EE.UU., **94:** 2415-2420, 1997.
Nilsson, D.E., "Old genes for new eyes", *Curr. Biol.,* **6:** 39-42, 1996.
Norman, C.; Ruswick, M.; Pollock, R. y Treisman, R., "Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the *c-fos* serum response element", *Cell,* **55:** 989-1003, 1988.
Nurrish, S.J. y Treisman, R., "DNA binding specificity determinants in MADS-box transcription factors", *Mol. Cell Biol.,* **15:** 4076-4085, 1995.
Nüsslein-Volhard, C., "Determination of the embryonic axes of *Drosophila*", *Development,* (**S1**)**:** 1-10, 1991.
———; Frohnhofer, H.G. y Lehmann, R., "Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila", Science,* **238:** 1675-1681, 1987.

——— y Wieschaus, E., "Mutations affecting segments number and polarity in *Drosophila", Nature,* **287:** 795-801, 1980.

Olson, E.N.; Perry, M. y Schulz, R.A., "Regulation of muscle differentiation by the mef2 family of MADS box transcription factors", *Dev. Biol.,* **172:** 2-14, 1995.

Onuma, Y.; Takahashi, S.; Asashima, M.; Kurata, S. y Gehring, W.J., "Conservation of *Pax6* function and upstream activation by Notch signaling in eye development of frogs and flies", *PNAS,* EE.UU., **99:** 2020-2025, 2002.

Otting, G.; Qian, Y.Q.; Billeter, M.; Muller, M.; Affolter, M. y cols., "Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution", *EMBO J.,* **9:** 3085-3092, 1990.

Ouweneel, W.J., "Developmental genetics of homoeosis", *Adv. Genet.,* **18:** 179-248, 1976.

Pabo, C.O. y Sauer, R.T., "Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition", *Ann. Rev. Biochem.,* **61:** 1053-1095, 1992.

Parcy, F.; Nillson, O.; Busch, M.A.; Lee, I. y Weigel, D., "A genetic framework for floral patterning", *Nature,* **395:** 561-566, 1998.

Passner, J.M.; Ryoo, H.D.; Shen, L.; Mann, R.S. y Aggarwal, A.K., "Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex", *Nature,* **397:** 714-719, 1999.

Pelaz, S.; Ditta, G.S.; Baumann, E.; Wisman, E. y Yanofsky, M.F., "B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes", *Nature,* **405:** 200-203, 2000.

———; Tapia-López, R.; Álvarez-Buylla, E.R. y Yanofsky, M.F., "Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*", *Curr. Biol.,* **11:** 182-184, 2001.

Pellegrini, L.; Tan, S. y Richmond, T.J., "Structure of serum response factor core bound to DNA", *Nature,* **376:** 490-498, 1995.

Pineda, D.; Rossi, L.; Batistoni, R.; Salvetti, A.; Marsal, M.; Gremigni, V.; Falleni, A.; Gonzalez-Linares, J.; Deri, P. y Salo, E., "The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is *Pax6* independent", *Development,* **129:** 1423-1434, 2002.

Pnueli, L.; Abu-Abeid, M.; Zamir, D.; Nacken, W.; Schwarz-Sommer, Z. y Lifschitz, E., "The MADS-box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis", Plant J.,* **1:** 255-266, 1991.

Pollard, S.L. y Holland, P.W., "Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry", *Curr. Biol.,* **10:** 1059-1062, 2000.

Popovici, C.; Leveugle, M.; Birnbaum, D. y Coulier, "*Homeobox* gene clusters and the human paralogy map", *FEBS Lett.,* **491:** 237-242, 2001.

Purugganan, M.D., "The MADS-box floral homeotic gene lineages predate the origins of seed plants: phylogenetic and molecular clock estimates", *J. Mol. Evol.,* **45:** 392-396, 1997.

———, "The molecular population genetics of regulatory genes", *Mol. Ecol.,* **9:** 1451-1461, 2000.

———; Rounsley, S.D.; Schmidt, R.J. y Yanofsky, M.F., "Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family", *Genetics,* **140:** 345-356, 1995.

Qian, Y.Q.; Billeter, M.; Otting, G.; Mueller, M.; Gehring, W.J. y Wütrich, K. "The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors", *Cell,* **59:** 573-580, 1989.

———— ; Furukubo-Tokunaga, K.; Reséndez-Pérez, D.; Müller, M.; Gehring, W.J. y Wütrich, K., “Nuclear magnetic resonance solution structure of the fushi tarazu homeodomain from *Drosophila* and comparison with the Antennapedia homeodomain”, *J. Mol. Biol.,* **283:** 333-345, 1994.

———— ; Otting, G.; Billeter, M.; Müller, M.; Gehring, W. y Wütrich, K., “Nuclear magnetic resonance spetroscopy of a DNA complex with the uniformly 13C-labeled Antennapedia homeodomain and structure determination of the DNA-bound homeodomain”, *J. Mol. Biol.,* **234:** 1070-1083, 1993.

Quiring, R.; Walldorf, U.; Kloter, U. y Gehring, W.J., “Homology of the *eyeless* gene of Drosophila to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans”, *Science,* **265:** 785-789, 1994.

Riechmann, J.L.; Heard, J.; Martin, G.; Reuber, L.; Jiang, C.; Keddie, J.; Adam, L.; Pineda, O.; Ratcliffe, O.J.; Samaha, R.R.; Creelman, R.; Pilgrim, M.; Broun, P.; Zhang, J.Z.; Ghandehari, D.; Sherman, B.K. y Yu, G., “*Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes”, *Science,* **290:** 2105-2010, 2000.

———— ; Krizek, B.A. y Meyerowitz, E.M., “Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA*, and *AGAMOUS”, PNAS,* EE.UU., **93:** 4793-4798, 1996b.

———— ; Wang, M. y Meyerowitz, E.M., “DNA-binding properties of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA* and *AGAMOUS”, Nucleic Acids Res.,* **24:** 3134-3141, 1996a.

———— y Meyerowitz, E.M., “MADS domain proteins in plant development”, *Biol. Chem.,* **378:** 1079-1101, 1997.

Sakai, H.; Medrano, L.J. y Meyerowitz, E.M., “Role of SUPERMAN in maintaining *Arabidopsis* floral whorl boundaries”, *Nature,* **378:** 199-203, 1995.

Salazar-Ciudad, I.; Newman, S.A. y Sole, R.V., “Phenotypic and dynamical transitions in model genetic networks. I. Emergence of patterns and genotype-phenotype relationships”, *Evol. Dev.,* **3:** 84-94, 2001.

Salser, S.J. y Kenyon, C., “Patterning *C. elegans* homeotic cluster genes, cell fates and cell migrations”, *Trends Genet.,* **10:** 159-164, 1994.

Schubert, F.R.; Niesely-Struwe, K. y Gruss, P., “The Antennapedia-type homeobox genes have evolved from three precursors separated early in metazoan evolution”, *PNAS,* EE.UU., **90:** 143-147, 1993.

Schwarz-Sommer, Z.; Hue, Y.; Huijser, P.; Flor, P.J.; Hansen, R.; Tetens, F.; Lönnig, W.; Saedler, H. y Sommer, H., “Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene deficiens: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development”, *EMBO J.,* **1:** 251-263, 1992.

———— ; Huijser, P.; Nacken, W.; Saedler, H. y Sommer, H., “Genetic control of flower development: homeotic genes in *Antirrhinum majus”, Science,* **250:** 931-936, 1990.

Scott, M.P. y Weiner, A.J., “Structural relationships among genes that control development sequence homology between the *Antennapedia*, *Ultrabithorax*, and *fushi tarazu loci* of *Drosophila*”, *PNAS,* EE.UU., **81:** 4115-4119, 1984.

Sharkey, M.; Graba, Y. y Scott, M.P., “*Hox* genes in evolution: protein surfaces and paralog groups”, *Trends Genet.,* **13:** 145-151, 1997.

Shore, P. y Sharrocks, A.D., “The MADS-box family of transcription factors”, *Eur. J. Biochem.,* **229:** 1-13, 1995.

Shubin, N.; Tabin, C. y Carroll, S., “Fossil, genes and the evolution of animal limbs”, *Nature* **388:** 639-648, 1997.

Slack, J.M.; Holland, P.W. y Graham, C.F., "The zootype and the phylotypic stage", *Nature,* **361:** 490-492, 1993.

Smocovitis, V.B. *Unifying Biology: the Evolutionary Synthesis and Evolutionary Biology*, Princeton University Press, EE.UU., 1996.

Sommer, H.; Beltrán, J.P.; Huijser, P.; Pape, H.; Lönnig, W.P.; Saedler, H. y Schwarz-Sommer, Z., "Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in Antirrhinum majus: the protein shows homology to transcription factors", *EMBO J.,* **9:** 605-613, 1990.

Spirov, A.V.; Borovsky, M. y Spirova, O.A. "HOX Pro DB: the functional genomics of hox ensembles", *Nucleic Acids Res.,* **30:** 351-353, 2002.

St. Johnston, D. y Nüsslein-Volhard, C., "The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo", *Cell,* **68:** 201-219, 1992.

Sündstrom, J.; Carlsbecker, A.; Svensson, M.E.; Svenson, M.; Johanson, U.; Theissen, G. y Engström, P., "MADS-box genes active in developing pollen cones of Norway spruce (*Picea abies*) are homologous to the B-class floral homeotic genes in angiosperms", *Dev. Genet.,* **25:** 253-266, 1999.

Svensson, M.E.; Johannesson, H. y Engström, P., "The *LAMB1* gene from the clubmoss, *Lycopodium annotinum*, is a divergent MADS-box gene, expressed specifically in sporogenic structures", *Gene,* **253:** 31-43, 2000.

Tanabe, Y.; Hasebe, M.; Nozaki, H. e Ito, M., "Analysis of MADS-box gene from *Chara* (*Chara braunii*) which is one of green algae closely related to land plants", *Int. Bot. Cong.* (Abstract), **XVI:** 297, 1999.

Tandre, K.; Albert, V.A.; Sundas, A. y Engström, P., "Conifer homologues to genes that control floral development in angiosperms", *Plant Mol. Biol.,* **27:** 69-78, 1995.

——— ; Svenson, M.; Svensson, M.E. y Engström, P., "Conservation of gene structure and activity in the regulation of reproductive organ development of conifers and angiosperms", *Plant J.,* **15:** 615-623, 1998.

——— The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana, Nature,* **408:** 796-815, 2000.

Theissen, G.; Becker, A.; Di Rosa, A.; Kanno, A.; Kim, J.T.; Munster, T.; Winter, K.U. y Saedler, H., "A short history of MADS-box genes in plants", *Plant Mol. Biol.,* **42:** 115-149, 2000.

——— ; Kim, J.T. y Saedler, H., "Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box genes subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes", *J. Mol. Evol.,* **43:** 484-516, 1996.

——— y Saedler, H., "Plant biology: floral quartets", *Nature,* **409:** 469-471, 2001.

Thieffry, D.; Colet, M. y Thomas, R., "Formalisation of regulatory networks: a logical method and its automatization", *Math. Model. Sci. Comput.,* **2:** 144-151, 1993.

Tomarev, S.I.; Callaerts, P.; Kos, L.; Zinovieva, R.; Halder, G.; Gehring, W. y Piatigorsky, J., "Squid *Pax-6* and eye development", *PNAS,* EE.UU., **94:** 2421-2426, 1997.

Treisman, J.E., "A conserved blueprint for the eye?", *BioEssays,* **21:** 843-850, 1999.

Valentine, J.W.; Erwin, D.H. y Jablonsky, D., "Developmental evolution of metazoan bodyplans: the fossil evidence", *Dev. Biol.,* **173:** 373-381, 1996.

——— ; Jablonski, D. y Erwin, D.H. () Fossils, molecules and embryos: new perspectives on the Cambrian explosion. *Development,* **126:** 851-859, 1999.

Vergara-Silva, F., "La homeosis y la macroevolución", *Ciencias,* **65:** 42-50, 2002.

———— ; Martínez-Castilla, L. y Álvarez-Buylla, E.R., "MADS-box genes: development and evolution of plant body plans", *J. Phycol.,* **36:** 803-812, 2000.

———— y Álvarez-Buylla, E.R., "Los genes homeóticos en la era molecular y la construcción de una biología evolutiva del desarrollo", en Rudomín, P., Blázquez, Graf, N., eds., *Ciencias de la Vida,* Siglo XXI, UNAM, México, 2001.

Waddington, C.H., *Organisers and Genes*, Cambridge University Press, EE.UU., 1940.

————, "Growth and determination in the development of Drosophila", *Nature,* **149:** 264-265, 1942.

————, "The interactions of some morphogenetic genes in *Drosophila", J. Genet.,* **51:** 243-258, 1953.

————, *Principles of Development and Differentiation*, Macmillan, 1966.

Wagner, A., "Genetic redundancy caused by gene duplication and its evolution in networks of transcriptional regulators", *Biol. Cyber.,* **74:** 557-567, 1996.

Weigel, D., "The genetics of flower development: from floral induction to ovule morphogenesis", *Ann. Rev. Genetics,* **29:** 19-39, 1995.

————; Alvarez, J.; Smyth, D.; Yanofsky, M.F. y Meyerowitz, E.M., "LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis", Cell,* **69:** 843-859, 1992.

———— y Meyerowitz, E.M, "The ABCs of floral homeotic genes", *Cell,* **78:** 203-209, 1994.

Wilkins, A.S., "Canalization: a molecular genetic perspective", *BioEssays,* **19:** 257-262, 1997.

Wilson, D.S.; Guenther, B.; Desplan, C. y Kuriyan, J., "High resolution crystal structure of a paired (Pax) class cooperative homeodomain dimer on DNA", *Cell,* **82:** 709-719, 1995.

———— y Desplan, C., "Homeodomain proteins. Cooperating to be different", *Curr. Biol.,* **5:** 32-34, 1995.

Winchester, G., "The Morgan lineage", *Curr. Biol.,* **6:** 100, 1996.

Winter, K.U.; Becker, A.; Münster, T.; Kim, J.T.; Saedler, H. y Theissen, G., "MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants", *PNAS,* EE.UU., **96:** 7342-7347, 1999.

————; Weiser, C.; Kauffmann, K.; Bohne, A.; Kirchner, C.; Kanno, A.; Saedler, H. y Theissen, G., "Evolution of class B floral homeotic proteins: obligate heterodimerization originated from homodimerization", *Mol. Biol. Evol.,* **19:** 587-596, 2002.

Wolberger, C., "Homeodomain interactions", *Curr. Opin. Struct. Biol.,* **6:** 62-68, 1996.

————; Vershon, A.K.; Liu, B.S.; Johnson, A.D. y Pabo, C.O., "Crystal structure of a mat alpha-2 homeodomain operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions", *Cell*, **67:** 517-528, 1991.

Wolpert, L., "Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation", *J. Theor. Biol.,* **25:** 1-47, 1969.

————, "Positional information and pattern formation", *Curr. Top. Dev. Biol.,* **6:** 186-224, 1971.

————, "Positional information and pattern formation in development", *Dev. Genet.,* **15:** 485-490, 1994.

————, "One hundred years of positional information", *Trends Genet.,* **12:** 359-364, 1996.

Wray, G.A. y Abouheif, E., "When is homology not homology?", *Curr. Opin. Genet. Dev.,* **8:** 675-680, 1998.

Yamada, "Control mechanisms in cellular metaplasia", en Harris, R.; Allin, A. y Viza, D., eds., *Cell Differentiation*, Munksgaard, Dinamarca, 1972.

Yanofsky, M.F., "Floral meristems to floral organs: genes controlling early events in *Arabidopsis* flower development", *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.,* **46:** 167-188, 1995.

———— ; Ma, H.; Bowman, J.L.; Drews, G.N.; Feldman, K.A. y Meyerowitz, E.M., "The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene AGAMOUS resembles transcription factors", *Nature,* **346:** 35-40, 1990.

Zuckerkandl, E., "Molecular pathways to parallel evolution: I. Gene nexyses and their morphological correlates", *J. Mol. Evol.,* **39:** 661-678, 1994.

PARTE II

Estructuras celulares



Ultraestructura de elementos citoplásmicos en donde se observan estructuras celulares como cisternas apiladas y elementos tubovesiculares del aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y membrana plasmática.

CAPÍTULO 6

LA MEMBRANA CELULAR

Marcelino Cereijido Mattioli ■ **Rubén Gerardo Contreras Patiño**
Liora Shoshani ■ **Arturo Ponce Balderas**



Introducción

Por más de un siglo, la membrana celular no fue más que una suposición. Pero, para explicar la necesidad teórica que llevó a suponer que existe una membrana, debemos recordar que un osmómetro es un dispositivo de dos cámaras acuosas separadas por una membrana semipermeable, que permite pasar a las pequeñas moléculas de agua, pero no a las más grandes del soluto. A mediados del siglo XIX, al observar que las células se hinchan cuando son sumergidas en soluciones hipotónicas y se contraen y arrugan al ser bañadas en hipertónicas, los biólogos las asemejaron a osmómetros, analogía que por supuesto requería que estuvieran rodeadas por una membrana semipermeable. Los detractores comprendieron la necesidad teórica de una membrana, pero objetaron que nadie la había visto. Teniendo en cuenta que la membrana mide 10 nm de espesor y, por lo tanto, no se puede ver con un microscopio óptico, la objeción no sorprende. Más aún, cuando después de la Segunda Guerra Mundial (1939 a 1945) se emplearon microscopios electrónicos, sólo se pudo "ver" la membrana celular después de fijarla y teñirla con tetróxido de osmio (OsO_4), porque, cortada perpendicularmente, aparece como un par de rayitas negras paralelas, que asemejan vías de tren. Pero ni así se convencieron algunos biólogos, pues atribuyeron esa imagen a un artefacto producido por la precipitación del osmio.

La membrana mide 10 nm de espesor.

Ya a principios de este siglo, Gortel y Grendel tomaron glóbulos rojos, los vaciaron de hemoglobina, disolvieron lo que quedó de ellos ("fantasmas") con solventes de lípidos y lo esparcieron sobre una superficie de agua con lo que, claro está, se formó una mancha (figura 6-1) (Cereijido y Rotunno, 1971). Esas manchas se deben a que las moléculas de los lípidos de la membrana son anfipáticos (una punta de la molécula busca sumergirse en el agua y a la otra la repele), y forman una mancha de una molécula de espesor que tiene aproximadamente el doble de área (2**a**) que la de los glóbulos rojos (**a**) de los que se extrajeron los lípidos o, para expresarlo de otra manera,

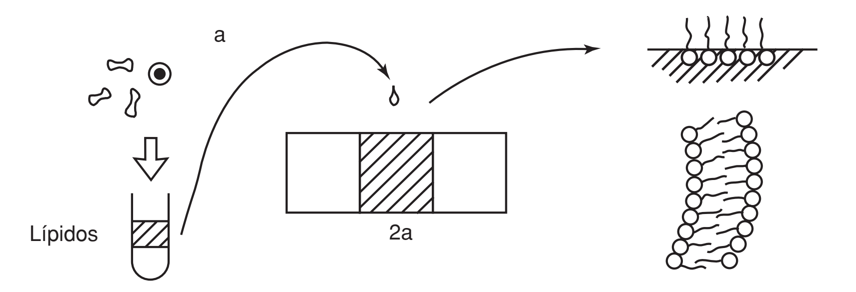


Figura 6-1. Origen de la idea de que la membrana celular es una bicapa lipídica. Gortel y Grendel tomaron cierta cantidad de glóbulos rojos, que en su conjunto tenían un área a y le extrajeron los lípidos. Al ser puestos sobre una superficie de agua (centro) formaron una mancha (sombreado) cuya área era el doble de la de los glóbulos (2a), en la que cada una de las moléculas de lípidos sumergió su cabeza hidrofílica (círculo) en el agua, y orientó su cadena hidrofóbica hacia el aire (arriba derecha). Esto llevó a suponer que las membranas consisten en dos capas monomoleculares de lípidos orientados como se muestra en la parte inferior derecha: una hojuela expone sus grupos hidrofílicos hacia el agua intracelular, la otra hacia el agua extracelular, y ambas esconden sus colas hidrofóbicas en el seno de la membrana.

alcanzaría para envolver dos veces a cada eritrocito. Surgió así el primer modelo de membrana celular: una capa bilipídica como se ilustra a la derecha de la figura 6-1. Además, se hizo la suposición, por demás obvia, de que cada lípido escondería su mitad hidrofóbica en el seno de la membrana y expondría su porción hidrofílica al agua citoplasmática o a la extracelular.

Ciertos hechos apoyaban dicho modelo y otros que lo hacían insatisfactorio. Veamos algunos de los que tienen valor didáctico porque fueron forjando las ideas actuales.

- **Observaciones a favor.** Si se toma una probeta con 50 mililitros de agua y 50 de aceite, se agrega cierta sustancia, se agita y se espera a que se separen ambas fases, se puede encontrar que esta sustancia se disolvió exclusivamente en el agua (hidrofílica), exclusivamente en el aceite (hidrofóbica) o se repartió en cierta proporción (coeficiente de partición). Repitiendo esa prueba con diversos tipos de sustancias, se encontró que aquellas que tienen mayor capacidad de disolverse en lípido penetran en las células (permeabilidad) con mayor facilidad, tal y como si debieran atravesar la barrera de lípidos que propone el modelo.
- **Observaciones en contra.** 1) Se encontró que las moléculas de tamaño muy pequeño (por ejemplo, urea, eritritol) penetran en la célula con mucha mayor facilidad[1] de la que permitía esperar de su solubilidad en

[1] La observación de que ciertas sustancias penetran más fácilmente de lo que cabe esperar de su solubilidad en lípidos, generó el concepto de "difusión facilitada". Luego se encontró que esta "facilitación" se debe a la existencia de poros, canales, acarrreadores, bombas, sistemas de exocitosis, pinocitosis, etcétera, que hacen innecesaria la antigua nomenclatura de "difusión facilitada".

lípidos. Esto provocó una modificación del modelo de capa bilipídica: debe haber poros, explicaron, por los cuales las moléculas pequeñas se pueden colar. Para probarlo, midieron la permeabilidad de moléculas de diversos tamaños como si, para estimar el tamaño de un orificio en la pared, uno tratara de pasar municiones, canicas, pelotas de ping-pong, tenis, baseball, futbol... Así estimados, los poros resultaron tener unos 0.5 nm de radio. 2) La segunda objeción derivó de una situación análoga a la que causaría el observar que las pelotas de tenis no pasan... salvo que sean verdes, pues, de pronto, un tipo de aminoácido tiene una permeabilidad diez mil veces mayor que la de otro de igual tamaño. 3) Para que una molécula de glucosa abandone el agua extracelular, se disuelva en los lípidos de la membrana y penetre en el agua citoplásmica, necesita una energía considerable para despegar las moléculas de agua unidas a sus oxhidrilos. Esta energía es tan alta que sería prácticamente imposible que la glucosa penetre a una célula, conclusión por demás conflictiva, pues es uno de los metabolitos más comunes. Esta paradoja requirió, una vez más, que se modificara el modelo.

De modo que la historia de la membrana celular es una larga sucesión de modelos, hallazgo de excepciones y proposición de modificaciones. El análisis de los mecanismos de translocación de sustancias a través de membranas requirió estudios de flujos[2] en función de la concentración de una sustancia, en presencia de moléculas competidoras, de otras que no compiten, pero se pegan a la membrana y modifican la permeabilidad, inhibidores metabólicos, hormonas, a diversas temperaturas, y recursos bioquímicos como son la destrucción y separación de componentes subcelulares, extracción de la membrana con solventes, detergentes, presencia de urea, utilización de anticuerpos para marcar determinado componente, etcétera. Así se llegó a tener una idea de cómo es y cómo funciona esa membrana celular que, así y todo, no se puede "ver".



Estructura de la membrana celular

Hidrofilia vs hidrofobia

Tomada globalmente, la molécula de agua es eléctricamente neutra, pero la región de su oxígeno es negativa y la de sus hidrógenos, positiva. Esto hace que, cuando se acerca a un catión, por ejemplo, el Na^+ o el K^+, el agua se le pegue por su oxígeno y que, por el contrario, cuando se acerca a un anión, por ejemplo, el Cl^-, se pegue por la zona de los hidrógenos. También hace

[2] El flujo (J) es la cantidad de una sustancia que pasa por unidad de tiempo (seg), por unidad de área (cm^2) y por unidad de fuerza impulsora (potencial electroquímico). Este potencial surge de la diferencia de concentración (ΔC) de esa sustancia, entre ambos lados de la membrana (moles) y, si la sustancia tiene carga eléctrica neta, se agrega el potencial eléctrico entre ambas caras ($\Delta\psi$ en mV).

que las moléculas de agua acerquen las cargas de unas a las opuestas de las otras y construyan una estructura cristalina (hielo). Pero por encima de cero grado de temperatura, la vibración, rotación y choque entre moléculas destruye la estructura y por eso el agua es líquida. Cuando la atracción eléctrica que ejerce un ion, sujeta a las moléculas de agua a su superficie, éstas se quedan relativamente quietas y la unión que pueden hacer con otras moléculas de agua es más firme. Esto provoca que cada ion se desplace con una "cáscara" de agua organizada en una estructura que, si bien no tiene la regularidad del hielo, se le asemeja bastante.

Pero, aunque un soluto no sea iónico, es decir, no tenga cargas eléctricas que atraigan moléculas de agua, así y todo les apantalla los choques que podrían llegar desde su lado (figura 6-2a). Esto hace que alrededor de dichos solutos se formen estructuras de agua, con una organización más elaborada que las del agua en el seno de la solución (figura 6-2b). Desde el punto de vista entrópico, resulta entonces más favorable que esos solutos sean eliminados de la solución y permitan que el agua que se organizó, por estar protegida de los choques, se desorganice. La "hidrofobia" de los lípidos, que los lleva a no mezclarse con el agua, no es más que un ardid que evita que el agua se organice alrededor de sus moléculas en cuanto se meten en el seno del agua. Pero si la molécula de soluto tiene regiones hidrofílicas que la retienen, así y todo en el seno de la solución, se seguirá paseando con su región hidrofóbica cubierta de "hielo" (figura 6-2c). Se puede dar el caso de que la molécula de soluto pueda contorsionarse, de manera tal, que esconda sus regiones hidrofóbicas que, de lo contrario, permitirían organizar estructuras de "hielo". Tal es el caso de la albúmina (figura 6-2d) que por eso es soluble en agua. El caso de la figura 6-2c puede dar lugar a que dos de tales moléculas se unan por sus regiones hidrofóbicas y eviten que se les forme "hielo" (figura 6-2e). Esta unión se conoce con el nombre de "puente hidrofóbico" y, aunque es de baja energía, tiene una gran importancia biológica.

Los lípidos de las membranas celulares tienen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas.

Como las moléculas de los lípidos de las membranas celulares tienen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas, dan lugar a nuevas situaciones de las que explicaremos dos. La primera se presenta cuando la zona hidrofílica es relativamente más voluminosa que las colas, en cuyo caso las moléculas forman esferitas con la cabeza orientada hacia el agua y las colas hidrofóbicas escondidas en su seno (micelas)(figura 6-2f). La segunda se origina cuando las

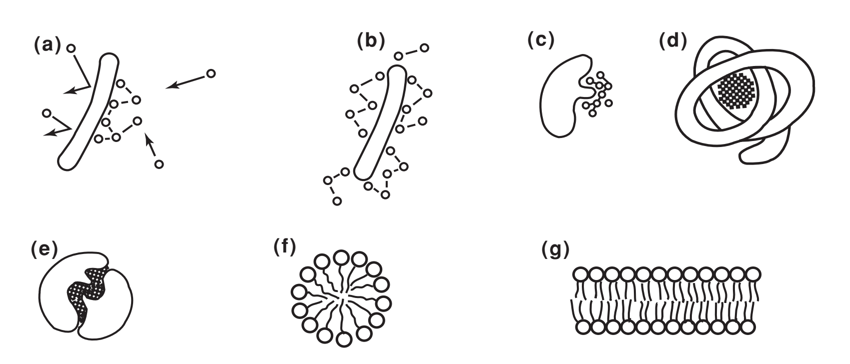


Figura 6-2.

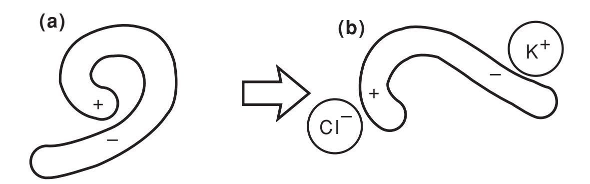


Figura 6-3.

colas hidrofóbicas son muy voluminosas, no pueden ser escondidas en el seno de micelas y forman espontáneamente capas como se ilustra en la figura 6-2g. Ésta es, precisamente, la característica de las membranas biológicas.

Para entender la estructura de las membranas celulares conviene introducir algunas nociones más: 1) Para atraer moléculas de agua, un soluto no necesita tener cargas eléctricas. Puede hacerlo porque en su superficie asoman grupos químicos que unen moléculas de agua por su oxhidrilo o por sus hidrógenos. Estas uniones se llaman "puentes de hidrógeno" y son más difíciles de romper que los "puentes hidrofóbicos". Es claro que estos puentes no sólo se pueden establecer entre un soluto y el agua, sino entre las moléculas de agua o entre los solutos. 2) Si el soluto tiene una carga eléctrica, va a preferir unirse a un segundo que tenga una carga eléctrica opuesta. Este tipo de unión se llama "electrostática" y es más fuerte que los puentes de hidrógeno. 3) A veces estas cargas de signo opuesto se encuentran en una misma molécula (figura 6-3a), pero si de pronto aparecen iones que resultan ser más preferidos, la unión intramolecular se desprende y la molécula en sí cambia de configuración (figura 6-3b). 4) La atracción electrostática se describe por la Ley de Coulomb, es decir, decae con el cuadrado de la distancia. Pero hay otro tipo de uniones, que se establecen, por ejemplo, entre las porciones hidrofóbicas de los lípidos, llamadas fuerzas de Van der Waals, que decaen con la quinta potencia de la distancia, es decir, un pequeño alejamiento las desvanece. Este caso es muy importante para entender las membranas biológicas, porque cuando dos lípidos tienen sus uniones saturadas (-C-C-C-C-) sus colas hidrofóbicas son rectas (figura 6-4a), y se mantienen juntas y firmemente unidas. Pero cuando tienen insatura-

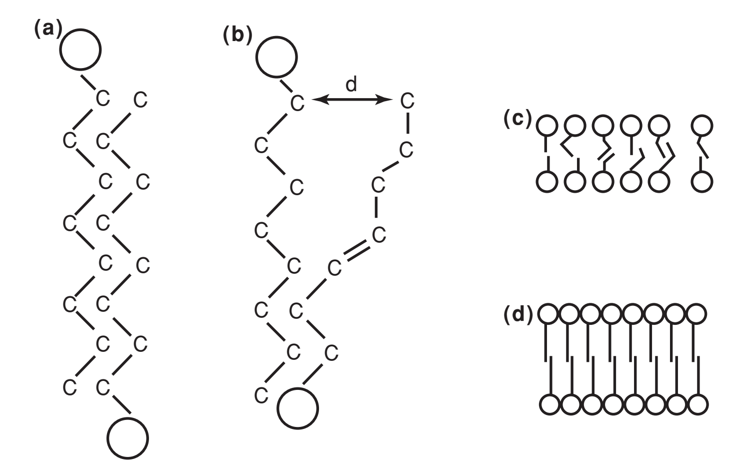


Figura 6-4. Cuando los lípidos son saturados (una sola ligadura entre C y C), sus cadenas son rectas y se pueden empacar muy densamente **a).** Cuando entre dos carbonos hay una insaturación (-C=C-), la cadena no es recta y no se puede aparear con la vecina **b).** Como la atracción entre las cadenas es inversamente proporcional a la quinta potencia de la distancia, la unión entre moléculas vecinas resulta ser muy débil. Cuando una membrana tiene lípidos de cadena corta e insaturada **c),** su estructura resulta muy laxa y permeable. Por el contrario, cuando son saturados y largos, la estructura es muy compacta y poco permeable **d).**

ciones (-C-C=C-C-), las cadenas hidrofóbicas presentan un ángulo en la doble ligadura, no resultan paralelas, se alejan y la fuerza de Van der Waals no las mantienen unidas. Es claro que, cuando los lípidos de una membrana son largos (tienen muchos carbonos) y están saturados, es más densa, compacta y difícil de atravesar (figura 6-4d) que cuando los tiene insaturados y cortos (figura 6-4c). La osmolaridad del Mar Muerto es tan alta que puede chuparle el agua a las células y matarlas. Pero así y todo, no es estéril, porque contiene bacterias cuyas membranas están hechas de lípidos muy largos y saturados, que no sólo se unen estrechamente con los de sus compañeros de monocapa, sino que se imbrican y pegan con las colas de los de la hojuela opuesta.

El componente lipídico de las membranas

Los lípidos de las membranas biológicas tienen generalmente 16, 18 o 20 carbonos de largo y presentan de 0 a 3 dobles ligaduras.

Los lípidos de las membranas biológicas tienen generalmente 16, 18 o 20 carbonos de largo y presentan de 0 a 3 dobles ligaduras. Los más sencillos son los ácidos grasos, que consisten en una larga cadena hidrocarbonada unida a un grupo ácido (-COOH). Uno, dos o tres de estos ácidos grasos se pueden unir a los grupos hidroxilos del glicerol. Este conjunto se puede unir a su vez a un fosfato (que autoriza a llamarlos fosfolípidos) y, a su través, a una base, que suele ser una serina, o una etanolamina, o una colina (que por eso se llaman fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina) (figura 6-5). Las membranas de los eucariontes contienen además colesterol y algunos de sus derivados, que por supuesto se relacionan con el agua a través de su grupo oxhidrilo y esconden sus partes hidrofóbicas en el seno de la membrana.

Finalmente, conviene puntualizar que las diversas especies lipídicas no están igualmente representadas en ambas hojuelas de la bicapa. Así, en la membrana de los eritrocitos, la fosfatidilcolina se encuentra principalmente en la hojuela extracelular y la fosfatidilserina en la citoplásmica.

El componente proteico de las membranas

Como el dios Proteo de la mitología griega tenía la facultad de conocer el futuro, era continuamente asediado por los curiosos. Pero él tenía, además,

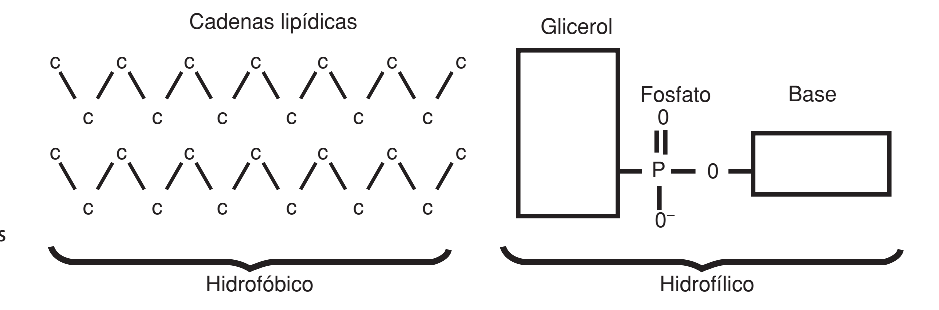


Figura 6-5. Componentes esenciales de una molécula de fosfolípido.

la capacidad de adoptar formas diferentes y conseguía despistarlos. Por eso, cuando a principios de siglo los bioquímicos encontraban ciertos tipos de moléculas cuyas propiedades cambiaban de acuerdo con las fuentes de las que las extraían, a los procedimientos y solventes que usaban los llamaron "proteínas". Esta circunstancia es particularmente aleccionadora en el caso de las proteínas de membranas.

Los conceptos ilustrados en las figuras 6-2 y 6-3 ya preludian las razones de este polimorfismo molecular, pues la conformación de las proteínas depende de los tipos de ambiente en que están, los iones y detergentes presentes en la solución de extracción, el pH, etc. Pero en el caso de las proteínas de membrana se agregan otros factores, pues el mero hecho de tener que extraerlas de la membrana para analizarlas, ya les cambia la conformación y las propiedades fisiológicas: un receptor, una bomba o un canal iónico completamente purificados, es decir, sin restos de membrana, no transducen señales, ni bombean ni conducen. Es como purificar las bocinas de un radio: una vez "puras", ya no suenan. Hasta hace pocos años se acostumbraba a clasificar las proteínas de las membranas en integrales y periféricas, pero hoy, hay tantos casos intermedios, que esa taxonomía resulta poco útil. De modo que partiremos del caso de una proteína hipotética, de la que ya se sepa que forma parte de la membrana y cuya secuencia de aminoácidos se conoce (figura 6-6).

Hasta hace pocos años se acostumbraba a clasificar las proteínas de las membranas en integrales y periféricas.

La cadena peptídica de las proteínas es hidrofílica, pero sus residuos de aminoácidos pueden ser hidrofílicos (por ejemplo, lisina, histidina, asparagina) o hidrofóbicos (por ejemplo, alanina, valina, glicina) y, entre éstos, los puede haber cargados positiva (arginina, lisina, histidina) o negativamente

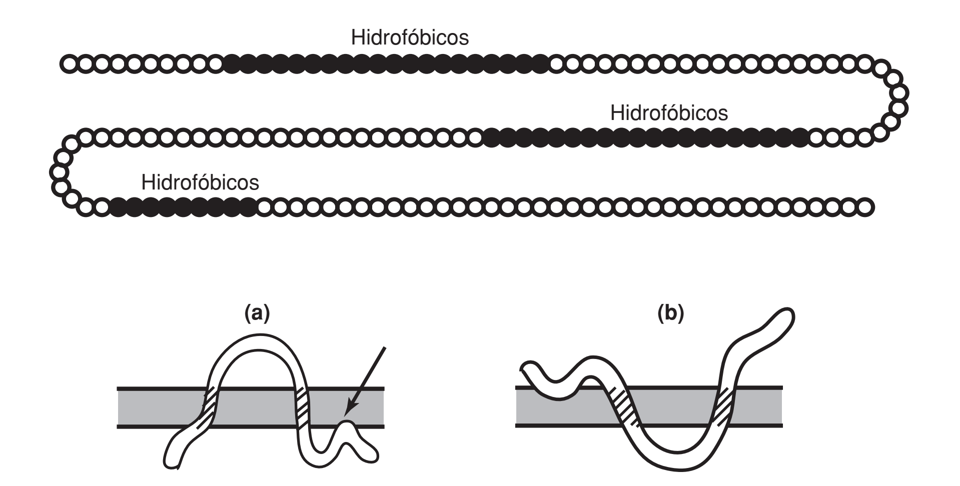


Figura 6-6. Hidrofilia/Hidrofobia de una proteína de membrana. En estudios anteriores se encontró que, en la secuencia de aminoácidos (círculos, parte superior), hay dos segmentos predominantemente hidrofóbicos (círculos negros) cuya longitud permitiría que la proteína atraviese toda la matriz lipídica. Un tercer segmento de aminoácidos hidrofóbicos no alcanza para atravesar toda la membrana, sugiriendo que la proteína sólo se ancla con él a la membrana (flecha). Se plantea entonces una disyuntiva: ¿**a** o **b**?

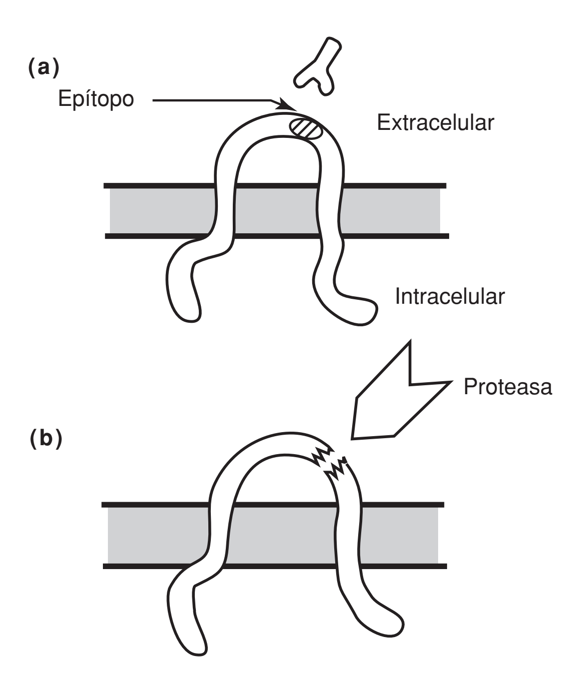


Figura 6-7. Para decidir la orientación de una proteína de membrana, se puede recurrir a la combinación con un anticuerpo **a)** o a cortar con una proteasa **b)**, en este caso, desde el lado extracelular.

(ácido aspártico, ácido glutámico). Para que una porción de la proteína pueda alojarse en la matriz hidrófóbica de la membrana, es necesario que exponga regiones de aminoácidos hidrofóbicos y esconda los residuos hidrofílicos. En el caso de que la cadena atraviese toda la membrana, necesita un segmento hidrofóbico de unos 19 aminoácidos. Sobre esta base, el péptido en cuestión podría estar ubicado en la membrana como en la figura 6-6a o 6-6b. ¿Cuál de las dos es la correcta? Para contestarlo, se pueden adoptar varios procedimientos; veamos dos. Un camino sería preparar un anticuerpo contra el segmento **"epítopo"** (figura 6-7a), y ver si se le pega (antes de destruir la célula) por el lado extracelular, en cuyo caso la proteína está orientada como indica la figura 6-7a, o desde el intracelular. Un segundo sería atacar a la célula con una proteasa que, se sabe de antemano, la corta, digamos, en el punto **"proteasa"** (fig. 6-7b) y ver si la corta cuando se agrega desde afuera de la célula.

Por otra parte, los análisis bioquímicos podrían indicar que se trata de una proteína glicosilada en un par de asparaginas (figura 6-8). Esos análisis podrían indicar además que se trata de una proteína fosforilable en el punto P. Además de tener glicoproteínas, las membranas celulares pueden te-

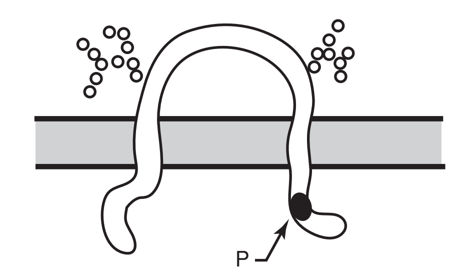


Figura 6-8. Se ilustra una proteína de membrana glicosilada en dos lugares extracelulares (arbolitos de hidratos de carbono) y fosforilable en un extremo intracelular (P).

ner proteolípidos y glicolípidos, en cuyo modo de análisis e inserción no nos detendremos.

Muchas proteínas de membrana se asocian a otras para formar dímeros, tetrámeros, etc. que, dependiendo de si son iguales se llaman homodímeros, homotetrámeros, etcétera. Cuando uno de estos componentes exhibe la mayoría de las propiedades fisiológicas, como es el caso de la Na^+-K^+-ATPasa (*vide infra*), que hidroliza ATP, une Mg^{2+}, Na^+, K^+, ouabaína y transloca iones, se le llama subunidad α, y a los otros pétidos del complejo se las llama subunidad α, γ, etcétera.

Muchas proteínas de membrana se asocian a otras para formar dímeros, tetrámeros, etcétera.

Además de unirse entre sí y con otros componentes de la membrana, las proteínas pueden unirse a proteínas del citoplasma que las anclan a los microfilamentos, microtúbulos, filamentos intermedios o forman parte de alguna cadena de transducción de señales. Análogamente, hay proteínas que reconocen y se unen a componentes de la matriz extracelular, o forman estructuras que les permiten asociarse a células vecinas, como es el caso de los desmosomas, uniones oclusoras y uniones comunicantes, que serán tratadas en otros capítulos. Finalmente, hay proteínas que permanecen en la membrana, hasta que la llegada de un ligando les provoca un cambio químico (por ejemplo, una fosforilación) a raíz del cual adoptan una conformación que las desvincula de la membrana.

Además de unirse entre sí y con otros componentes de la membrana, las proteínas pueden unirse a proteínas del citoplasma que las anclan a los microfilamentos, microtúbulos, filamentos intermedios o forman parte de alguna cadena de transducción de señales.

Tras estas consideraciones, nos es fácil entender que, hasta hace pocos años, las proteínas de membranas se clasificaran con base en las formas y dificultades para extraerlas de la membrana, con detergentes iónicos (por ejemplo, deoxicolato de sodio, dodecilsulfato de sodio), no-iónicos (por ejemplo, Tritón X-100), si se necesitaban solventes con altas concentraciones salinas, si debían contener quelantes para quitarles el Ca^{2+} que actúa como puente salino entre moléculas vecinas, etcétera.

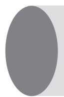
Hay proteínas que reconocen y se unen a componentes de la matriz extracelular, o forman estructuras que les permiten asociarse a células vecinas, como es el caso de los desmosomas, uniones oclusoras y uniones comunicantes.

La célula no sólo tiene membrana en su superficie

El núcleo, las mitocondrias, el aparato de Golgi, los lisosomas y los diversos tipos de vesículas citoplásmicas están rodeados de membranas muy similares a la membrana que limita la célula en su superficie, que venimos estudiando en el presente capítulo y que para diferenciarla a veces recibe el nombre de "membrana plasmática". Sin embargo, se diferencian entre sí, ya sea por su organización (por ejemplo, la del núcleo es doble, encierra un espacio virtual y está perforada por grandes poros que dejan pasar hasta macromoléculas) o por su composición (por ejemplo, la membrana de los lisosomas contiene glicoproteínas fosforiladas que no poseen las de las vesículas sinápticas).

El núcleo, las mitocondrias, el aparato de Golgi, los lisosomas y los diversos tipos de vesículas citoplásmicas están rodeados de membranas muy similares a la membrana que limita la célula en su superficie.

Las diversas membranas están continuamente desprendiendo pequeñas áreas que se cierran formando vesículas y van a fusionarse con otras membranas (por ejemplo, algunas del trans-Golgi van a la membrana plasmática, y viceversa). Esto crea un febril intercambio de membranas en cuya explicación no entraremos en este capítulo, pero que señala que las membranas celulares no son estructuras estáticas, sino que se están recambiando y reciclando a lo largo de toda la vida de la célula.



El movimiento de sustancias a través de las membranas

Dependiendo de la escala de tiempo en que se estudie (horas, días), toda estructura y molécula celular se recambia cíclicamente, de modo que la vida depende de una multitud de flujos con el medio que la rodea. Estos flujos (J) suelen anotarse J^{Na}, J^{gluc}, J^{cist}, para referirse al de sodio, glucosa, cisteína, etcétera. Es importante tener en cuenta que el flujo neto de una sustancia resulta de la diferencia entre el flujo de entrada (influjo) y el de salida (eflujo). Habitualmente, el flujo neto de sodio, potasio, cloro, calcio, agua, etcétera, es cero, porque las células gozan de perfecta salud y mantienen su composición constante. Pero así y todo, este equilibrio no es resultado de la quietud, sino de la perfecta paridad entre intensos influjos y eflujos de cada una de las diversas sustancias de las que depende la vida celular.

Un flujo depende de dos factores: la diferencia de potencial electroquímico ($\Delta\mu$) que lo impulsa, y un coeficiente de proporcionalidad, la permeabilidad (P), que indica el grado de facilidad con que la membrana lo deja pasar:

$$J_i = P \cdot \Delta\mu$$

El potencial electroquímico ($\Delta\mu$) resulta de la combinación de las fuerzas que puedan mover a una sustancia dada; en el caso de las membranas biológicas, derivan de la diferencia de concentración de una sustancia entre ambos lados de la membrana (ΔC), de la diferencia de potencial eléctrico ($\Delta\psi$) y de la diferencia de presión hidrostática (ΔP).

Clásicamente se consideraba que cada flujo dependía únicamente de su diferencia de potencial electroquímico (potencial conjugado) y que era independiente de cualquier otro potencial presente en el sistema. Por ejemplo, si había dos flujos, uno de electrones J^e impulsado por la diferencia de potencial eléctrico $\Delta\psi$, y otro de calor J^Q impulsado por el gradiente de temperatura ΔT, se consideraba que no había relación entre ellos, de modo que:

$$J^e = L_{12}\,\Delta\psi \qquad \text{(ecuación 1)}$$
$$J^Q = L_{21}\,\Delta T$$

donde los L_{12}, L_{21} o en general L_{ij}, son coeficientes de proporcionalidad. Hoy en cambio se considera que, si bien un flujo depende principalmente de su potencial, también puede estar impulsado por los potenciales conjugados a otros flujos. En el ejemplo que estamos considerando, el flujo de electrones tendría un componente clásico, debido al potencial eléctrico ($L_{11}\,\Delta\psi$) y otro debido al gradiente de temperatura ($L_{12}\,\Delta T$), y el flujo de calor tendría un componente clásico debido al gradiente de temperatura ($L_{21}\,\Delta T$) y otro debido al potencial eléctrico $L_{21}\,\Delta\psi$ situación que se expresa del siguiente modo:

$$J^e = L_{11}\,\Delta\psi + L_{12}\,\Delta T \qquad \text{(ecuación 2)}$$
$$J^Q = L_{21}\,\Delta T + L_{22}\,\Delta\psi$$

Los fenómenos termoeléctricos son ejemplos muy familiares de esta situación, porque una diferencia de temperatura, además de un flujo de calor, produce una

corriente eléctrica y, viceversa, un potencial eléctrico, además de generar una corriente, origina un flujo de calor. Bastaría que los coeficientes L_{12} y L_{21} valieran cero, para que las ecuaciones (2) se transformen en el caso clásico (ecuación 1). Pero cuando los L_{ij} no valen cero, se los llama "coeficientes de acople" y originan flujos eléctricos en ausencia de potenciales, o flujos de calor en ausencia de gradiente de temperatura. En resumen, un flujo tiene un componente clásico que se llama "conjugado", pero puede tener además otros que se llaman "acoplados". El alumno puede entender estas influencias mutuas entre flujos, imaginando el flujo de él y sus amigos hacia afuera de un estadio, en momentos en que entran, o por el contrario salen los fanáticos. Es probable que, aunque quieran salir (su concentración sea mayor en el estadio), no puedan hacerlo por su acople por fricción a las masas que entran.

> Un flujo tiene un componente clásico que se llama "conjugado", pero puede tener además otros que se llaman "acoplados".

¿Qué importancia tienen todas estas consideraciones para el caso de la membrana biológica? Muchísima, porque se trata de una barrera atravesada simultáneamente por decenas o centenas de flujos de diversas sustancias, en ambas direcciones, que no pueden dejar de acoplarse, porque se frotan al pasar, o al abordar una molécula de vehículo (*vide infra*) le cambian la afinidad por otras sustancias, su conformación, etcétera, o el potencial eléctrico que producen a unas atrae o repele a otras. Por ejemplo, la glucosa puede penetrar en la célula y acumularse en contra de su gradiente (por ejemplo, desde 2 mM extracelular a 10 mM citoplasmática), si está acoplada al flujo de sodio. Pero el caso más famoso es tal vez el del "transporte activo", que representa una cierta cantidad de Na^+, de K^+ o de Ca^{2+}, que no se mueve porque la impulse una diferencia de concentración o un potencial eléctrico, sino porque está acoplada al flujo de reacciones metabólicas, de la misma manera que los automóviles suben una loma, es decir, van en contra de la gravedad, porque su motor está acoplado al flujo de reacciones químicas que sufre la gasolina.

> La membrana biológica es una barrera atravesada simultáneamente por decenas o centenas de flujos de diversas sustancias, en ambas direcciones, que no pueden dejar de acoplarse, porque se frotan al pasar, o al abordar una molécula de vehículo.

> "El transporte activo", está acoplado al flujo de reacciones metabólicas.



Acarreadores

El concepto de acarreador

Un *acarreador* es una proteína integral de membrana que une determinada sustancia del medio acuoso de un lado, la transloca hasta el lado opuesto y la libera (figura 6-9). La sustancia se mueve a favor de su gradiente de

> Un *acarreador* es una proteína integral de membrana que une determinada sustancia del medio acuoso de un lado, la transloca hasta el lado opuesto y la libera.

Figura 6-9. El modelo de acarreador (ping-pong).

concentración, a velocidades mucho mayores de lo que predicen las leyes de difusión y con una especificidad exquisita, capaz de discriminar moléculas que difieren por la presencia de un oxhidrilo, un amino, etc., o por la orientación de uno de sus átomos de carbono (D-glucosa versus L-glucosa).

El transporte mediado por acarreadores y las reacciones enzimáticas muestran una analogía notable. En ambos casos, hay proteínas catalizadoras (acarreador o enzima), muy selectivas y presentes en una cantidad pequeña que resulta limitante. Cuando la concentración de la sustancia a transportar o del sustrato es lo suficientemente alta, la proteína catalizadora se satura y el flujo o la velocidad de reacción, según corresponda, ya no aumenta (figura 6-10).

Los acarreadores se distinguen de los otros mecanismos de transporte por la velocidad a la que transportan.

Los acarreadores se distinguen de los otros mecanismos de transporte por la velocidad a la que transportan: en los acarreadores es en general más rápida (10^2–10^4 moléculas por segundo) que las bombas ($\leq 10^3$) y más lentas que los canales ($10^6 - 10^7$).

Los *uniport* transportan una sola sustancia.

Los *simport* transportan dos sustancias en una misma dirección.

Tipos de acarreadores

Los *uniport* transportan una sola sustancia, por ejemplo, el Glut-4 de los adipocitos y las células musculares, toma glucosa del torrente sanguíneo y la vierte al citosol. Los *simport* transportan dos sustancias en una misma dirección, como el péptido/H^+ que transporta hacia el interior de las célu-

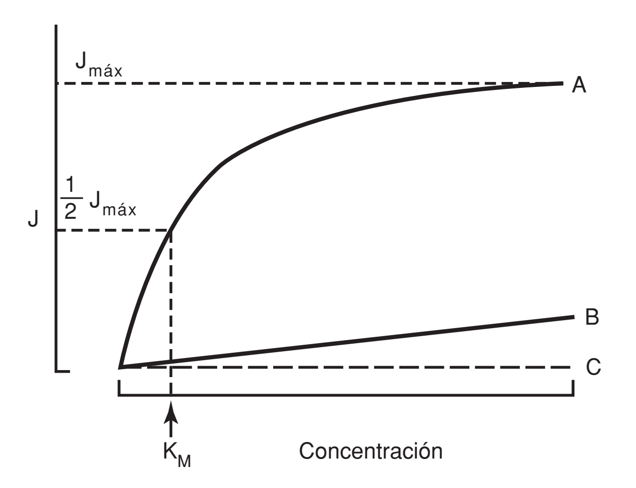


Figura 6-10. El flujo de D-glucosa se grafica en función de la concentración de la misma sustancia en el medio. Si es transportada por difusión simple se obtiene una curva como la C. Cuando la difusión es facilitada, por ejemplo, por la participación de un acarreador, la curva muestra una velocidad mayor y se satura a altas concentraciones de la sustancia (A). El isómero óptico L-glucosa no es reconocido por el acarreador (B). Dos parámetros son especialmente útiles para estudiar los acarreadores: el flujo máximo (**$J_{máx}$**) al que el acarreador funciona y la constante de unión acarreador-sustrato (**K_M**) o Constante de Michaelis. El $J_{máx}$ se obtiene cuando todos los acarreadores ya han unido la sustancia. La **K_M** es la concentración de sustancia a la que la velocidad de transporte es la mitad de la $J_{máx}$. Cada acarreador tiene un $J_{máx}$ y una K_M característicos.

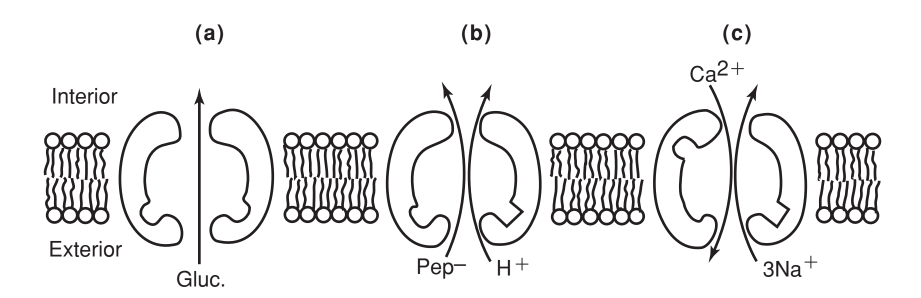


Figura 6-11. Tipos de acarreadores.

las epiteliales intestinales los protones y los tripéptidos producidos por la hidrólisis de proteínas en el tracto digestivo. A los simport se les conoce tambien como *cotransportadores*. Los *antiport* transportan también dos sustancias, pero en direcciones opuestas, razón por la que también se les conoce como *intercambiadores*. Así, el intercambiador Na^+/Ca^{2+}, presente en muchos tipos celulares eucariontes, toma tres iones Na^+ del exterior celular y los transporta al interior, a la vez que toma un ion Ca^{2+} del citosol, lo saca de la célula y así ayuda a mantener su concentración citosólica baja (figura 6-11).

Los *antiport* transportan también dos sustancias, pero en direcciones opuestas, razón por la que también se les conoce como *intercambiadores*.

El modelo ping-pong

En la figura 6-9 se muestran las características fundamentales del modelo de ping-pong: 1) el acarreador *tiene sitios de unión* de las sustancias a transportar. La unión de la sustancia en un lado de la membrana induce en el acarreador, 2) un *cambio de conformación*. Por lo tanto, el acarreador debe tener al menos dos estados conformacionales distintos (C_1 y C_2, figura 6-9). El cambio conformacional provoca que, 3) se *exponga el sitio de unión de la sustancia hacia el lado opuesto* de la membrana, y 4) que este sitio se modifique, y 5) la sustancia se *libere* y se *difunda* al medio acuoso del lado opuesto de la membrana, siguiendo su gradiente de concentración. En ausencia de la sustancia, el acarreador recupera la conformación inicial C_1.

Un cuerpo sólido de evidencias experimentales apoya a este modelo. Por ejemplo, es posible identificar los sitios de unión de la sustancia a transportar, agregándola al transpotador purificado e incorporado en liposomas, y observando cuánta y con qué afinidad se une. También se puede estudiar la afinidad y especificidad de los sitios de unión del acarreador por sus ligandos, con las técnicas clásicas de flujos, esencialmente midiendo el flujo máximo ($\mathbf{J}_{máx}$), que es función del número de acarreadores y de la K_M, que indica la afinidad del acarreador por la sustancia a transportar. Así la K_M del acarreador de glucosa del eritrocito para la D-glucosa es tres órdenes de magnitud inferior a la de L-glucosa. La especificidad de dichos sitios ha sido investigada comparando el transporte de sustancias estructuralmente similares. Así tenemos que el simport de glucosa/Na^+ es altamente específico para la D-glucosa y el isómero óptico L-glucosa prácticamente no se transporta (figura 6-9).

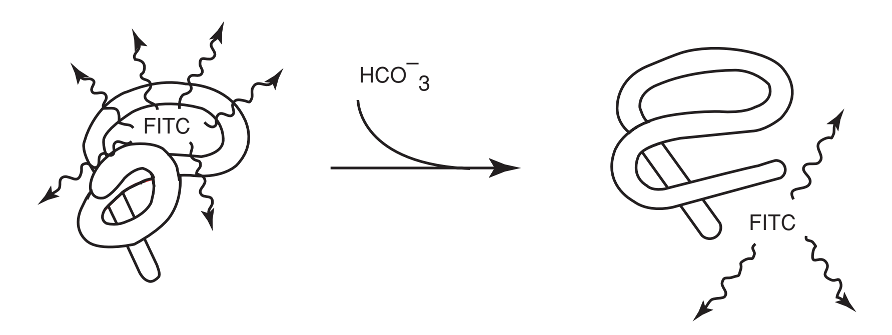


Figura 6-12. Detección del cambio conformacional con sondas fluorescentes. A la izquierda está el transportador unido al fluoróforo (fluoresceína, FITC). En presencia del ion que se encarga del transporte de la emisión de fluorescencia (flechas onduladas), disminuye, pues la FITC interactúa de manera distinta.

La existencia de dos estados conformacionales distintos se pone de manifiesto con diversas estrategias experimentales. Por ejemplo, el acarreador de Cl^-/HCO_3^- puede ser marcado con fluoresceína (FITC), una sustancia que fluoresce al ser excitada con luz azul. La intensidad de esta fluorescencia depende de la interacción que la FITC tenga con los grupos laterales de los aminoácidos del acarreador. En presencia de bicarbonato, el transportador marcado con FITC disminuye la fluorescencia. Esto indica que la FITC interactúa de manera distinta, según el acarreador se combine o no con la sustancia a transportar, lo que a su vez indica que en contacto con el ligando, el acarreador cambia de conformación (figura 6-12).

El detalle fino del cambio de conformación no se ha podido estudiar por cristalografía de rayos X, porque no se ha podido cristalizar ningún acarreador.

Hay, sin embargo, sustancias que funcionan como acarreadores solubles en la matriz lipídica de la membrana. La valinomicina, por ejemplo, es un péptido en forma de dona, que tiene una región exterior hidrofóbica que le permite embeberse y difundirse dentro de la membrana. Tiene también una región interior hidrofílica donde une al ion K^+. Cuando la valinomicina encuentra un K^+, lo captura en su interior, luego se difunde en la membrana y lo libera en el lado en el que está menos concentrado.

Relación estructura-función

Los acarreadores tienen dominios con los que se asocian a la membrana y también otros que pueden realizar funciones específicas.

Tal como sucede con otras proteínas, los acarreadores tienen dominios con los que se asocian a la membrana y también otros que pueden realizar funciones específicas. La figura 6-13 muestra la estructura y los dominios del intercambiador Ca^{2+}/Na^+. Su perfil hidropático predice 11 dominios transmembranales. En cuatro de estos dominios (2, 3, 8 y 9) se encuentran secuencias similares entre todos los intercambiadores Ca^{2+}/Na^+ hasta ahora secuenciados, que constituyen una "credencial de identificación" de la familia, pero a los que todavía no se les ha encontrado una función específica.

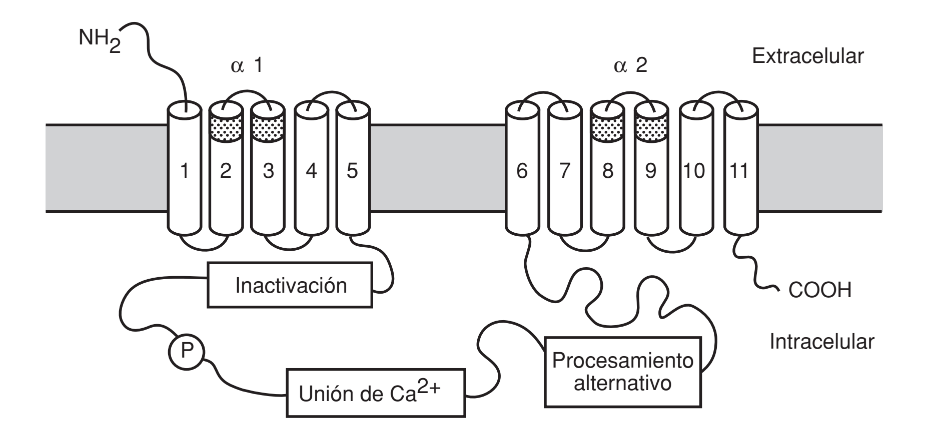


Figura 6-13. Estructura del intercambiador Ca^{2+}/Na^{+}. Con números se indican los dominios transmembranales.

La secuencia de los dominios 2 y 3 es muy semejante a la de los dominios 8 y 9, lo que ha llevado a pensar que el gen ancestral que dio origen a esta familia se duplicó en algún momento. Otras regiones se asocian a la regulación de la actividad de intercambiador a través de la fosforilación y por la presencia de Ca^{2+} y Na^{+} del citosol.

El intercambiador de bicarbonato/cloro y la respiración

El proceso de la respiración consiste en que las células de los animales vertebrados tomen O_2 y desechen el CO_2. Los eritrocitos transportan ambos gases por el torrente sanguíneo. Cuando pasan por los tejidos periféricos, el CO_2 se difunde hacia su interior, reacciona con una molécula de agua y produce el ion bicarbonato (HCO_3^-) y protones (H^+). Esta reacción es catalizada por la anhidrasa carbónica, una enzima abundante en el eritrocito. El intercambiador HCO_3^-/Cl^- saca estos iones HCO_3^- de los eritrocitos al mismo tiempo que mete iones cloruro (Cl^-) (figura 6-14a), generando así un am-

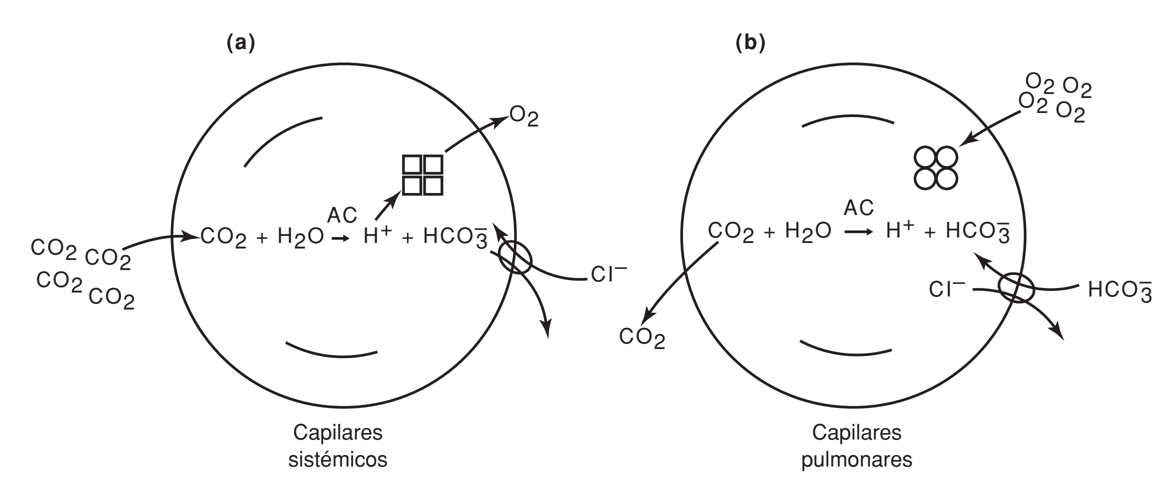


Figura 6-14. El intercambiador HCO_3^-/Cl^- y la respiración.

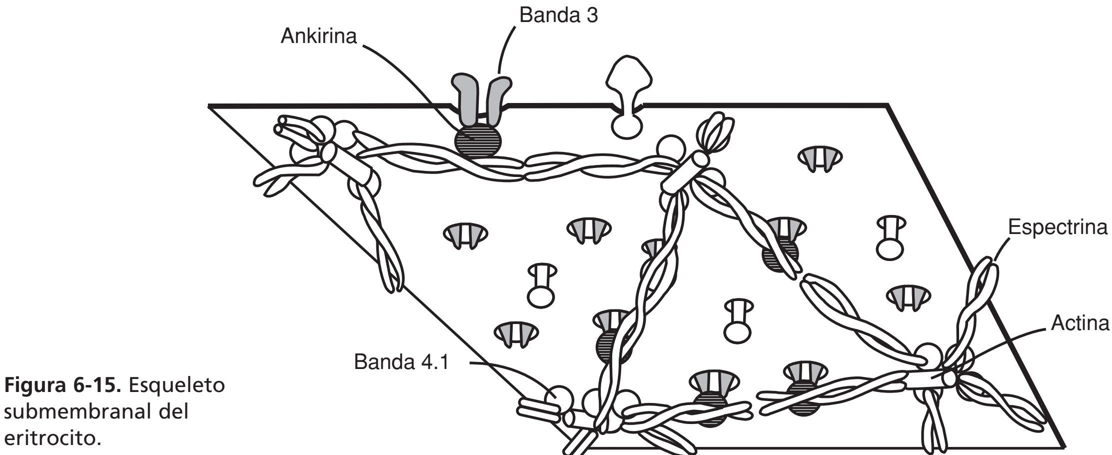


Figura 6-15. Esqueleto submembranal del eritrocito.

biente ácido en el citosol, que facilita la disociación del O_2 y la hemoglobina. El O_2 puede difundirse entonces hacia las células vecinas. La combinación de un acarreador con el ligando obedece a la ley de acción de masas. Por lo tanto, cuando los eritrocitos llegan a los capilares pulmonares, donde la tensión de O_2 es mayor, este gas (figura 14b) se asocia a la hemoglobina, la anhidrasa carbónica trabaja al revés, tomando ahora HCO_3^- y H^+ y produciendo CO_2 y H_2O. También trabaja al revés el intercambiador HCO_3^-/Cl^- que saca Cl^- y mete HCO_3^- al eritrocito, permitiendo que el CO_2 se difunda hacia la luz de los alvéolos.

El intercambiador HCO_3^-/Cl^- también se conoce como la proteína de la banda 3 de la membrana del eritrocito.

El intercambiador HCO_3^-/Cl^- también se conoce como la proteína de la banda 3 de la membrana del eritrocito. Tiene dos regiones claramente delimitadas: la carboxilo terminal, que incluye los 12 dominios transmembranales y se encarga de hacer el intercambio, y la amino terminal que se une al citoesqueleto subcortical de la membrana del eritrocito. Proteínas como la banda 4.1, la ankirina, la espectrina, la actina y la miosina forman esta red submembranal que mantiene ancladas a la membrana plasmática a la proteína de la banda 3 y a otras proteínas de membrana, como la glicoforina (figura 6-15). Es posible que esta asociación, además de localizar a las proteínas de membrana, desempeñe algún papel en la regulación de su función, como se ha sugerido para otras células (ver capítulo de adhesión celular).

Los acarreadores de solutos acoplados a iones

Muchas de las sustancias importantes para la célula atraviesan la membrana plasmática, aun en contra de su gradiente de concentración, porque el acarreador que utilizan transloca también un ion (Na^+, K^+, H^+, OH^-) que se mueve a favor de su gradiente electroquímico y fuerza a que el vehículo lleve a la primera sustancia al lado en que está más concentrada (figura 6-11b y c). El gradiente del ion constituye pues la fuerza impulsora. En casos en los que se requiere un transporte efectivo y veloz de soluto, el acople

puede ser hasta con 3 o 4 iones que se mueven a favor de su gradiente de concentración. A este tipo de transporte también se le conoce como transporte activo secundario (*vide infra*). Estos acarreadores pueden estudiarse con la estrategia de medir el transporte de la sustancia en presencia y ausencia de la del ion impulsor. Así, el *simport* sodio/glucosa incorporado en liposomas no puede transportar glucosa si el sodio no está presente en el medio e impulsa al acarreador.

Las células epiteliales del intestino expresan el cotransportador Na^+/glucosa SGTL1 en la región de la membrana que mira hacia la luz (apical) y el *uniport* de glucosa GLUT2 en la región orientada hacia la sangre (basolateral). El SGTL1 de la apical toma el sodio de la luz del intestino y lo mueve hacia el interior celular a favor de su gradiente de concentración. Otro mecanismo de transporte, la Na^+,K^+-ATPasa, genera el gradiente de sodio a expensas de la hidrólisis de ATP (*vide infra*). Simultáneamente, el SGTL1 toma glucosa de la luz y la transporta hacia el citosol, donde se va concentrando. La glucosa acumulada utiliza entonces al GLUT2 basolateral para salir hacia la sangre a favor de su gradiente de concentración. Al final, la glucosa, habiendo utilizado un cotransportador Na^+/glucosa y un acarreador exclusivo para ella, atraviesa el epitelio intestinal y es distribuida por el torrente sanguíneo al resto de las células del organismo (figura 6-16a).

Las mismas células del epitelio intestinal absorben los productos de la digestión de las proteínas de la dieta, principalmente en forma de péptidos pequeños (di-, tri-, y tetrapéptidos). Para ello utilizan el *simport* H^+/péptido. El gradiente impulsor en este caso es el de pH que va de 5.5, en la capa de agua no mezclada de la membrana apical, a 7 en el citosol. Los péptidos que llegan al interior celular son subsecuentemente transportados a la sangre por un mecanismo similar, o son metabolizados y transportados en forma de aminoácidos (figura 6-16b).

Los acarreadores de las sinapsis desempeñan un papel fundamental, pues se requiere que, una vez liberado el neurotransmisor, se estimulen los receptores apropiados de las membranas pre o postsinápticas para que

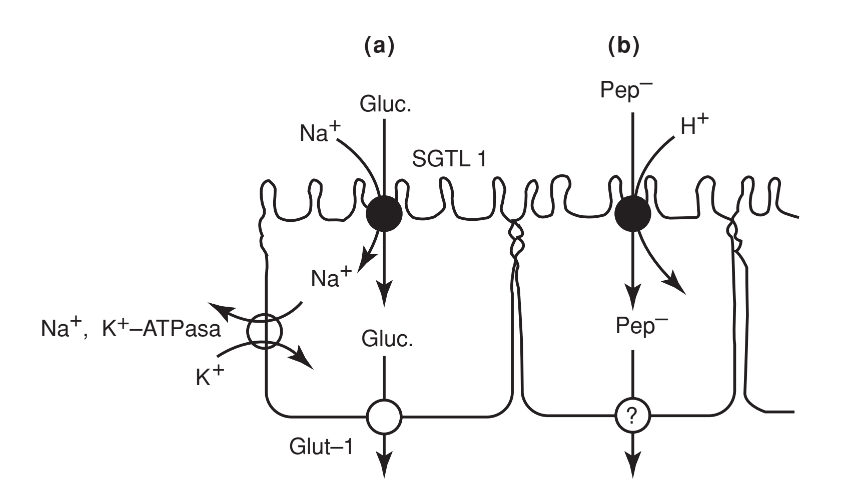


Figura 6-16. Células del epitelio intestinal. **a)** SGTL1 es el cotransportador Na^+/glucosa apical y GLUT2 simport de glucosa basolateral. **b)** Pept1 es el cotransportador H^+/oligopéptido.

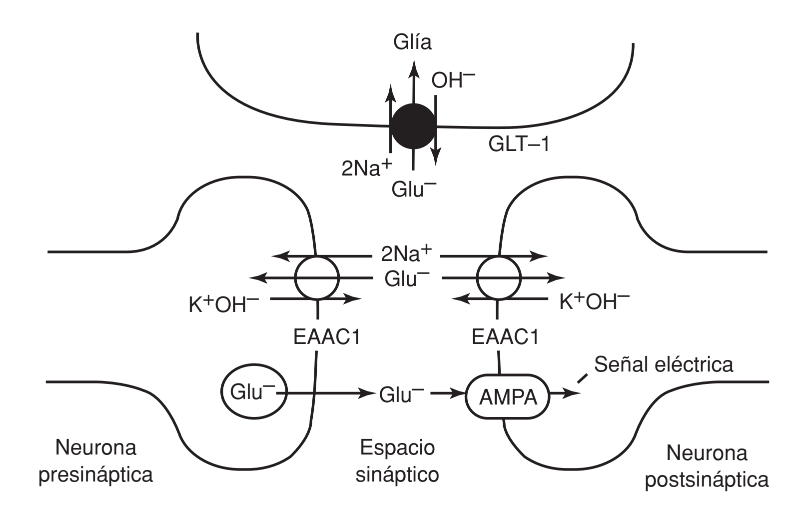


Figura 6-17. Sinapsis glutamatérgica. Glu^- es el neurotransmisor Glutamato, AMPA es uno de sus receptores en la membrana postináptica que al ser estimulado despolariza a la membrana y convierte la señal química en eléctrica. El Glu^- es retirado del espacio sináptico por el transportador de glutamato de alta afinidad de la neurona (EAAC1) y de la glía (GLT-1).

lo capturen (por ejemplo, el transportador de glutamato de alta afinidad de la neurona EAAC1 y el transportador de glutamato de la glía GLT-1) (figura 6-17).

Una característica estructural común de los acarreadores de solutos acoplados a iones es la de tener 12 dominios transmembranales, hecho que posiblemente se deba a que descienden de un ancestro común. También queda claro, con los ejemplos discutidos arriba, que los acarreadores trabajan en conjunto con otros acarreadores, bombas y canales, estableciendo relaciones complejas que finalmente llevan a cabo funciones como la de absorber nutrientes y transmitir señales.

La biología molecular y la electrofisiología en el estudio de los acarreadores

El poder clonar el gen y disponer del cDNA que codifica para el acarreador permiten estudiar su regulación a nivel de la transcripción y la transducción, hacer mutaciones para dilucidar qué relación guarda una secuencia en particular con la función del acarreador, encontrar si se expresan isoformas distintas y analizar cómo se regula su expresión. También ha tenido un impacto notable la introducción de técnicas electrofisiológicas para estudiar acarreadores que transportan más iones en un sentido que en el otro, es decir, que son electrogénicos. Por ejemplo, un acarreador normalmente no puede ser estudiado por técnicas de registro de corrientes en microáreas de membrana (*patch clamp*, ver más adelante en la sección de canales) porque mueve una cantidad relativamente escasa de iones y genera corrientes eléctricas demasiado pequeñas. Pero, si se sobreexpresa en ovocitos de sapo (*Xenopus*) y se usa para medir las corrientes un área muy grande de la membrana plasmática, se consigue una población de acarreadores enorme que translocan muchos iones y permite medir una corriente eléctrica significativa.

Los acarreadores que transportan más iones en un sentido que en el otro, son electrogénicos.



Transporte activo

En los sistemas pasivos, los solutos fluyen a favor del gradiente electroquímico que, como ya explicamos, es una combinación del gradiente de concentración (ΔC) con el de potencial eléctrico ($\Delta \psi$). Sin embargo, otros sistemas de transportes biológicos pueden conducirse en contra del gradiente electroquímico, lo que implica que requieren energía metabólica. Por lo tanto, se consideran sistemas de **transporte activo.** Lo más común es que se utilice la energía producida por la **hidrólisis de ATP,** pero existen también otros recursos energéticos, como son la energía de la luz y la del gradiente iónico.

En los sistemas pasivos, los solutos fluyen a favor del gradiente electroquímico.

El transporte activo se conduce contra un gradiente electroquímico y requiere energía.

Sistemas de acoplamiento de energía

La hidrólisis de ATP es esencialmente un proceso químico, mientras que la movilidad de especies a través de la membrana es proceso mecánico (movimiento). Por lo tanto, un proceso de transporte activo, que depende de la hidrólisis de ATP, acopla energía química libre a energía mecánica libre. La proteína bacteriorrodopsina de *Halobacterium halobium* acopla la energía de la luz a la energía mecánica. La fosforilación oxidativa acopla el transporte de electrones, la translocación de iones y la captura de energía química que permite una síntesis de ATP. En forma similar, el proceso general de fotosíntesis acopla la captura de la energía de la luz, la translocación de protones y el almacenamiento de energía química en ATP.

Un proceso de transporte activo, que depende de la hidrolísis de ATP acopla energía química libre a energía mecánica libre.

En este capítulo trataremos a las ATPasas de membrana, que son enzimas que acoplan la hidrólisis o síntesis de ATP al movimiento de un soluto a través de una membrana. Estas ATPasas se clasifican en tres grupos, de acuerdo con su composición proteica, localización celular y mecanismo de acción como se describe en la tabla 6-1. Las familias de ATPasas conocidas son las P-ATPasas, por el intermediario fosforilado, las V-ATPasas, por las vacuolares, y las F-ATPasas, por las porciones F_0 y F_1 que la constituyen (Pedersen y Carafoli, 1987).

Las ATPasas de membrana, son enzimas que acoplan la hidrólisis o síntesis de ATP al movimiento de un soluto a través de una membrana.

Las P-ATPasas

Las enzimas incluidas en esta familia transportan cationes a través de la membrana, en un ciclo catalítico que involucra la fosforilación de la enzima en un residuo de aspartato. Otra característica común que distingue a las P-ATPasas es el hecho que son inhibidas específicamente por vanadato.

Algunas de las P-ATPasas están compuestas de un solo polipéptido de alrededor de 100 kD, que hidroliza ATP y transporta cationes, como es el caso de las Ca^{2+}-ATPasas de membrana plasmática y del retículo sarcoplásmico. Otras P-ATPasas contienen subunidades adicionales, como es el caso de la Na^+, K^+-ATPasa y la H^+, K^+-ATPasa (subunidad β no catalítica).

Las P-ATPasas transportan cationes a través de la membrana, en un ciclo catalítico que involucra la fosforilación de la enzima en un residuo de aspartato.

Tabla 6.1. Comparación de los diferentes tipos de ATPasas de iones.

Propiedad	Tipo P	Tipo F	Tipo V
Número de subunidades diferentes	2	Mínimo 8	Mínimo 7
Iones transportados	H^+, Na^+, K^+, Ca^{2+}	H^+	H^+
Características funcionales	La subunidad –α se fosforila	Generalmente, funciona en la síntesis de ATP; se impulsa por el transporte de H^+, a favor de su gradiente electroquímico.	Generalmente, funciona hidrolizando ATP y generando gradiente electroquímico transmembranal de H^+.
Localización de la bomba	Membrana plasmática de plantas, hongos y bacterias (H^+-ATPasa). Membrana plasmática de eucariontes (Na^+, K^+ -ATPasa). Membrana de células del estómago (H^+, K^+-ATPasa). Membrana plasmática de todas las células eucariontes (Ca^{2+}-ATPasa). Membrana del retículo sarcoplásmico en células musculares (Ca^{2+}-ATPasa).	Membrana plasmática de bacterias. Membrana interna de mitocondria. Membrana del tilacoide y del cloroplasto.	Membranas vacuolares en plantas, levaduras y otros hongos. Membrana de lisosomas y endosomas en células animales. Membrana plasmática de ciertas células animales secretoras de ácido (por ejemplo, osteoclastos y algunas células del túbulo renal).

Recientemente, se describió la K^+-ATPasa de bacteria (Kdp) que incluye 3 subunidades (A y B catalíticas y C no catalítica) (Altendorf y Epstein, 1994). Aunque existe una gran diversidad en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de esta familia, todas presentan regiones muy conservadas, como son la región del aspartato, el aceptor del fosfato-γ del ATP, la región responsable a la actividad fosfatasa y las regiones de unión de los cationes. A continuación se describen algunos miembros de esta familia de P-ATPasas.

La Na^+, K^+-ATPasa de la membrana plasmática

Todas las células animales excluyen activamente iones de Na^+ y acumulan iones de K^+ gracias a la Na^+, K^+-ATPasa, conocida también como *bomba de sodio*. La mayoría de las células animales mantienen una concentración citosólica de Na^+ y de K^+ de 10 mM y 100 mM, respectivamente. El medio extracelular contiene típicamente de 100 a 140 mM Na^+ y 4 a 10 mM K^+. La bomba es responsable de estas asimetrías que genera el potencial eléctrico de membrana y regula el volumen celular. Las células animales dependen además de este gradiente, para impulsar (secundariamente) el

transporte de aminoácidos, azúcares, nucleótidos y otras sustancias. El mantenimiento del gradiente de Na^+ y K^+ le cuesta a la célula una gran cantidad de energía, que en el tejido neuronal puede llegar a 70% de su energía metabólica total.

La ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ se compone de dos subunidades, la subunidad α de aproximadamente 1,000 aminoácidos (110 kD) y la subunidad β, altamente glicosilada, de 300 residuos (35 kD). Aunque se desconoce la función precisa de la subunidad β, es esencial para la actividad de la enzima. Ambas subunidades están codificados por familias de multigenes. Se han identificado tres isoformas para la subunidad α (α1, α2 y α3) y dos para la subunidad β en mamíferos (β1 y β2; Martín-Vasallo y cols., 1989) y una tercera en anfibios (β3; Appel y cols., 1996).

La Na^+, K^+-ATPasa bombea activamente tres iones de Na^+ al exterior de la célula y dos de K^+ hacia el interior por cada molécula de ATP hidrolizada (figura 6-18). La hidrólisis ocurre en el lado citoplásmico de la membrana y el movimiento neto de una carga positiva al exterior de la célula hace que la bomba sea electrogenética. Si no hay movimiento neto de cargas, el transporte es eléctricamente neutro.

Basándose en los análisis de hidropatía de las secuencias de las subunidades α y β, así como en estudios de modificación química, se propuso el siguiente modelo para el arreglo de la proteína en la membrana (figura 6-19). El modelo describe 10 hélices α transmembranales para la subunidad α con dos dominios citoplásmicos grandes. El mayor de los dos, entre los segmentos 4 y 5, es el dominio de unión de ATP. La enzima se fosforila covalentemente, formando el intermediario E-P. Por métodos de modificación química, se identificó que el Asp^{369} es el sitio de fosforilación.

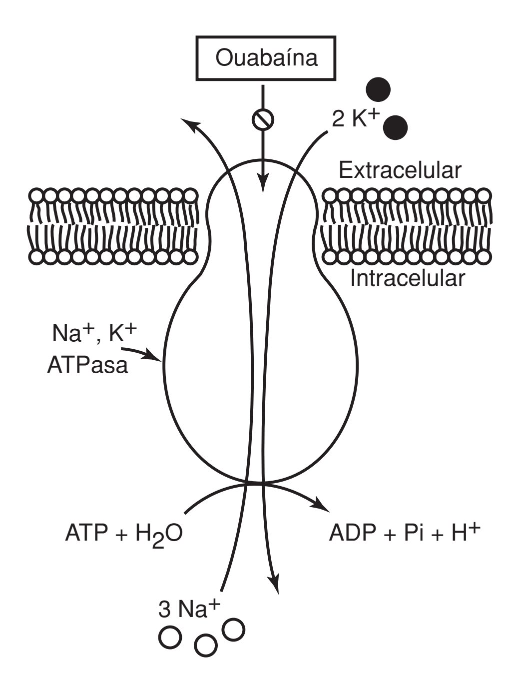
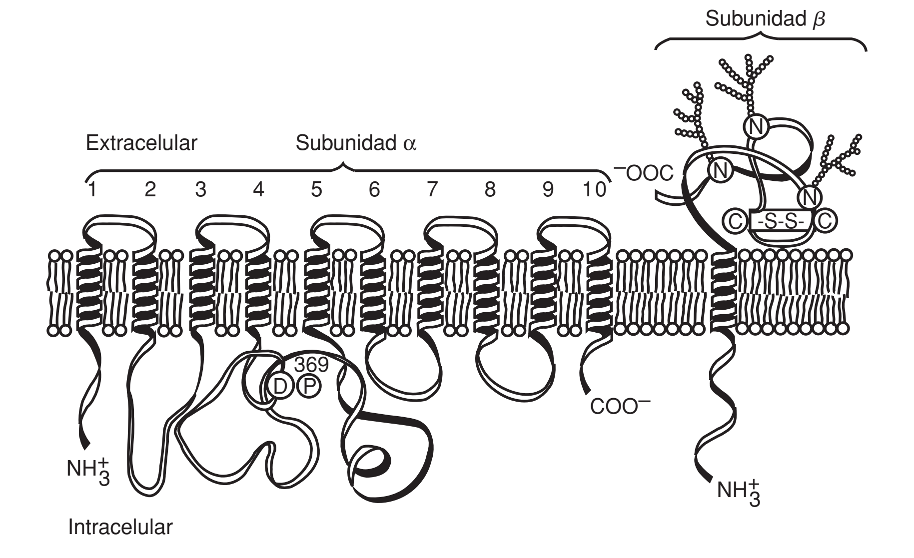


Figura 6-18. Esquema de la Na^+, K^+-ATPasa de la membrana plasmática de mamíferos. La hidrólisis de ATP ocurre en el lado citoplasmático de la membrana, los iones de Na^+ se transportan al exterior de la célula, y los iones de K^+ al interior. La estequiometría es de 3 Na^+ y 2 K^+ por cada molécula de ATP hidrolizada. La ouabaína, el inhibidor específico de la bomba, la inhibe uniéndose a la superficie extracelular de la proteína.

Figura 6-19. El modelo estructural de la Na^+, K^+-ATPasa en la membrana plasmática. El sitio de unión del ATP y el ácido aspártico fosforilable se encuentran en el dominio citoplásmico, entre los segmentos transmembranales 4 y 5 de la subunidad -α. La subunidad -β contiene un segmento transmembranal y un gran segmento extracelular glicosilado.



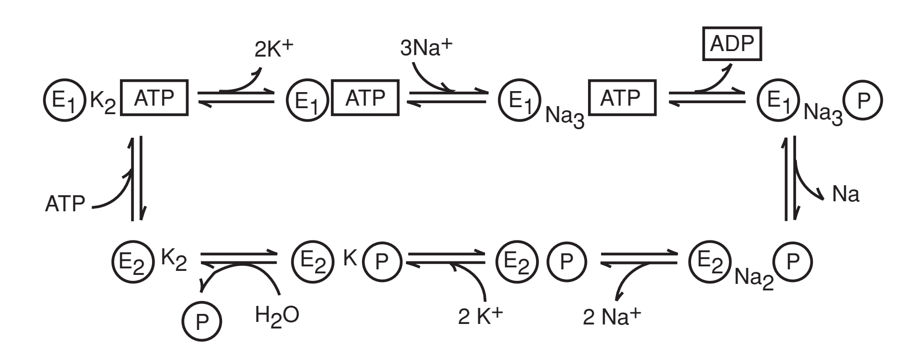


Figura 6-20. El mecanismo de reacción de la Na^+, K^+-ATPasa. El modelo asume dos conformaciones principales, E_1 y E_2. La unión de Na^+ a E_1 se sigue por la fosforilación y liberación de ADP. El transporte y la liberación de los iones de Na^+, así como la unión de los iones de K^+ ocurren antes de la desfosforilación. El transporte y la liberación de K^+ completan el ciclo.

El modelo simple del mecanismo catalítico de la enzima postula que ésta oscila entre dos conformaciones principales, E_1 y E_2 (figura 6-20). En la configuración E_1 tiene alta afinidad por el sodio y el ATP y se fosforila rápidamente en presencia de Mg^{2+}, formando el complejo E_1-P, que es un estado que contiene 3 iones de Na^+ ocluidos (fuertemente unidos, difíciles de disociar). Un cambio conformacional lleva al estado E_2-P, con baja afinidad a sodio, pero alta afinidad a potasio. La enzima en este estado libera 3 iones de sodio y une 2 de potasio en el lado extracelular. La desfosforilación deja a la enzima en la conformación E_2K_2, un estado con 2 iones de K^+ ocluidos. Otro cambio conformacional, que aparentemente se acelera por la unión de baja afinidad de ATP, libera los iones de K^+ al interior de la célula y regresa a la enzima a su conformación E_1. El estar al-

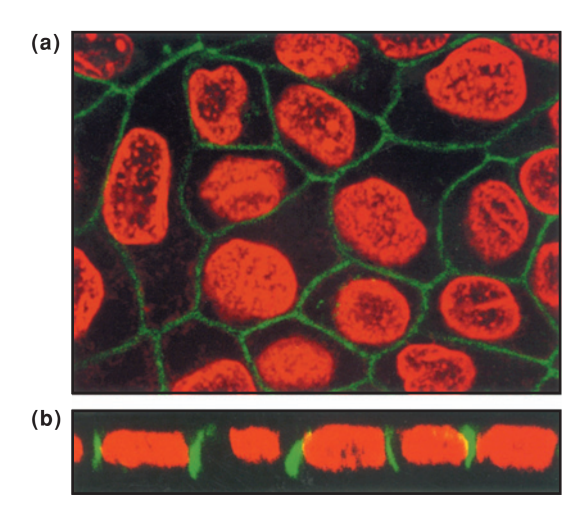


Figura 6-21. La distribución basolateral de la Na^+, K^+-ATPasa en células MDCK. Imágenes de inmunofluorescencia obtenidas por microscopia confocal de células MDCK derivadas de riñón de perro. Las células se trataron con un primer anticuerpo contra la subunidad-β de la Na^+, K^+-ATPasa y con un segundo anticuerpo conjugado a fluoresceína (FITC). Las líneas indican la subunidad-β de la Na^+, K^+-ATPasa y las estructuras redondas son los núcleos que fueron teñidos con yoduro de propidio. En **a)** se observa el patrón de distribución lateral, en un corte horizontal, y en **b)** en un corte vertical. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

ternando entre alta y baja afinidad para Na^+, K^+ y ATP permite acoplar la hidrólisis de ATP a la unión y transporte de los iones (Jorgensen y Andersen, 1988).

Mientras, en casi todas las células, la bomba de sodio se distribuye uniformemente en toda la membrana plasmática, en las epiteliales, la enzima se restringe a un dominio membranal, que es basolateral, como en el epitelio del riñón (figura 6-21), o apical, como en el caso del epitelio pigmentario de la retina. La Na^+, K^+-ATPasa establece el gradiente transepitelial de sodio que impulsa el transporte vectorial de iones y solutos a través de toda la célula epitelial.

La expresión de la bomba de sodio es tejido-específica y se modula por un conjunto de factores de transcripción, traducción y postraducción.

La Na^+, K^+-ATPasa se inhibe por glicósidos cardiacos.

Los esteroides de plantas y de animales como la *ouabaína* (figura 6-22) inhiben específicamente a la Na^+, K^+-ATPasa y al transporte de iones. Estas sustancias se conocen tradicionalmente como glicósidos cardiacos o este-

Figura 6-22. La estructura del glicósido cardiaco, la ouabaína.

roides cardiotónicos, por su potente efecto sobre el corazón. Los glicósidos cardiacos se unen exclusivamente a la superficie extracelular de la Na^+, K^+-ATPasa en el estado E_2-P, formando un complejo estable E_2-P/glicósido cardiaco (Forbrush, 1983).

En estudios clínicos de la presión sanguínea, se encontró que personas con hipertensión tienen en su sangre niveles elevados de un tipo de inhibidor de la Na^+, K^+-ATPasa. En estos pacientes, la inhibición de la bomba en las células de los vasos sanguíneos resulta en la acumulación de sodio y calcio en las células y en la disminución del diámetro de los vasos sanguíneos, ocasionando un aumento de la resistencia periférica e hipertensión. Recientemente, se aisló este inhibidor endógeno y se encontró que es una molécula relacionada con la ouabaína.

La Ca^{2+}-ATPasa

El calcio es un ion que actúa como mensajero celular en casi todas las células y tiene un papel especial en el músculo, donde es la señal que estimula su contracción. En reposo, los niveles de Ca^{2+} alrededor de las fibras del músculo son muy bajos (aproximadamente 0.1 mM) y casi todo el calcio está secuestrado en el complejo de vesículas llamado el **retículo sarcoplásmico** o **SR** que es una variante del artículo endoplásmico liso (REL). Los impulsos nerviosos inducen a las membranas del retículo sarcoplásmico a liberar rápidamente gran cantidad de Ca^{2+}, elevando la concentración de calcio intracelular aproximadamente a 10 mM. Esta concentración de Ca^{2+} estimula la contracción muscular. El relajamiento muscular requiere que los niveles de calcio regresen al estado de reposo. Esto se consigue por la actividad de la Ca^{2+}-ATPasa, que es la más abundante en la membrana del SR (70 a 80% de la proteína del SR) y es similar a la Na^+, K^+-ATPasa. Tiene una subunidad α de aproximadamente el mismo tamaño, forma un intermediario E-P y su mecanismo de acción es muy similar al de la Na^+, K^+-ATPasa. La secuencia de aminoácidos de la bomba de Ca^{2+} es homóloga con la subunidad α de la bomba de sodio, en particular con los dominios de unión de ATP y de fosforilación. Del análisis de hidropatía se predicen diez hélices transmembranales así como un "tallo" constituido por 5 segmentos helicoidales. Este "tallo" se encuentra entre la superficie de la membrana y el dominio citoplásmico globular, en que se encuentran los sitios de unión de ATP y de fosforilación. El complejo E-P formado por la Ca^{2+}-ATPasa del SR es un aspartil-fosfato como en la Na^+, K^+-ATPasa, pero en este caso el residuo es el Asp^{351}.

Por molécula de ATP hidrolizada, se transportan al interior del SR dos iones de Ca^{2+} y el mecanismo involucra dos conformaciones principales, E_1 y E_2, como en la Na^+, K^+-ATPasa. El estado que ocluye fuertemente los iones de Ca^{2+} es el E_1-Ca^{2+}-P, y estos iones ocluidos se disocian cuando la enzima se convierte en E_2-Ca^{2+}-P, cuya afinidad por el calcio es muy baja. En el estado E_1-Ca^{2+}-P los iones de Ca^{2+} están unidos al canal de transporte (Inesi y cols., 1990).

La H^+, K^+-ATPasa gástrica

El ambiente altamente ácido del estómago es esencial para la digestión de los alimentos. El pH en la luz del estómago normalmente es de 0.8 a 1, y en las células parietales de la mucosa gástrica de mamíferos es aproximadamente de 7.4. Esto representa un **gradiente de pH** a través de la membrana celular de la mucosa de 6.6, que constituye el mayor gradiente transmembranal conocido en células eucariontes. Este gradiente se debe mantener constantemente en el estómago para la digestión de los alimentos, sin que se dañen las células y órganos en su cercanía. EL gradiente se mantiene porque la **H^+, K^+-ATPasa** utiliza la energía de hidrólisis de ATP para sacar H^+ de las células de la mucosa y vertirlo en el lumen del estómago, a cambio de K^+, por lo que resulta eléctricamente neutro. El K^+ transportado al interior de la célula se vuelve a sacar por otro sistema que lo cotransporta con Cl^-, sistema que, por lo tanto, es también electroneutro (figura 6-23). El resultado neto de estos dos procesos de transporte es el movimiento de HCl hacia la luz del estómago.

La H^+, K^+-ATPasa tiene gran similitud con la Na^+, K^+-ATPasa de la membrana plasmática y con la Ca^{2+}-ATPasa del retículo sarcoplásmico, incluyendo su peso molecular. Forma así mismo intermediario E-P y varias regiones del péptido son homólogas con la Na^+, K^+-ATPasa y la Ca^{2+}-ATPasa (Kraut y cols., 1995).

Las V-ATPasas transportan protones desde el lado citosólico al lado exoplásmico de la membrana, en contra del gradiente electroquímico de protones.

Las V-ATPasas

Las V-ATPasas transportan protones desde el lado citosólico al lado exoplásmico de la membrana, en contra del gradiente electroquímico de protones,

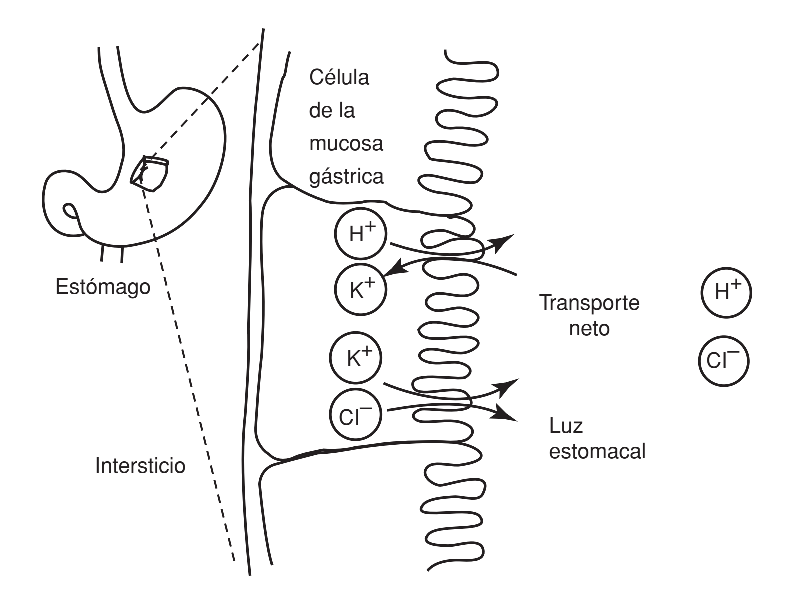


Figura 6-23. La H^+, K^+-ATPasa de las células de la mucosa gástrica media el transporte de protones al estómago. Los iones de K^+ se reciclan por medio del cotransportador K^+/Cl^-. La acción de estas dos bombas resulta en el transporte neto de HCl al interior del estómago.

utilizando la energía de la hidrólisis de ATP. Las ATPasas del tipo V (vacuolares) mantienen el bajo pH de las vacuolas de plantas, levaduras y hongos. También se las encuentra en membranas de lisosomas y endosomas en células animales, así como en la membrana plasmática de ciertas células secretoras de ácido, como son los osteoclastos y células del túbulo renal. Todas las V-ATPasas conocidas translocan H^+, no forman un intermediario fosforilado durante su ciclo de reacción y están compuestas por subunidades múltiples. La masa molecular de estas enzimas ha sido estimada entre 400 y 700 kD y están formadas por 8 a 10 subunidades. La función de hidrólisis de ATP y la del transporte de H^+ se realizan en diferentes subunidades. Las V-ATPasas contienen dos dominios: un dominio hidrofílico, orientado hacia el citosol (V_1), compuesto de 5 polipéptidos diferentes, y un dominio transmembranal (V_0) que contiene varias copias del proteolípido **c** y una copia del polipéptido **a.** La composición del dominio citosólico es A_3B_3CDE. Las subunidades A y/o la B contienen los sitios de unión e hidrólisis del ATP. Cada subunidad **c** atraviesa la membrana varias veces. Las subunidades **a** y **c** juntas forman el canal por el cual se conducen los protones.

La bomba de protones del osteoclasto

Un ejemplo de las V-ATPasas es la bomba de H^+ del osteoclasto. Los osteoclastos son células multinucleadas que funcionan durante la remodelación normal del hueso y constituyen una fuente de calcio en circulación e influyen en tejidos blandos como los nervios y los músculos (Roodman, 1996). Aproximadamente, 5% de la masa ósea del cuerpo humano se está remodelando en todo momento. Al completarse el crecimiento, el organismo equilibra el crecimiento de nuevo tejido óseo por medio de una síntesis que llevan a cabo los osteoblastos y una reabsorción por parte de los osteoclastos. Los osteoclastos poseen una bomba de protones (H^+-ATPasa) del tipo V en la porción de la membrana plasmática que está en contacto con el hueso. Esta región se llama borde rugoso. El osteoclasto se une al hueso, formando una cavidad entre la superficie del hueso y la membrana celular (figura 6-24). La bomba en el borde rugoso bombea protones hacia este espacio, creando una solución ácida que disuelve la matriz mineral del hueso. En este caso, el transporte de protones hacia el exterior de la célula dis-

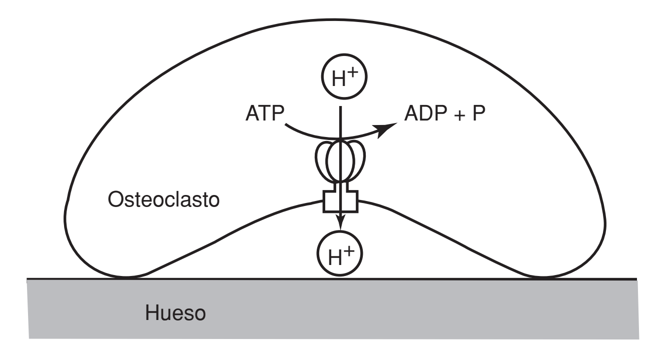


Figura 6-24. La H^+-ATPasa del osteoclasto. Las bombas de protones se acumulan en el borde rugoso de los osteoclastos y funcionan para transportar H^+ al espacio entre la membrana celular y la superficie del hueso. La alta concentración de H^+ en este espacio sirve para disolver la matriz mineral del hueso.

minuye el pH extracelular a 4, aproximadamente, que permite solubilizar al fosfato de calcio.

Las F-ATPasas

Las F-ATPasas se encuentran en bacterias, cloroplastos y mitocondrias.

Las ATPasas F_0F_1 o tipo F se encuentran en bacterias, cloroplastos y mitocondrias. Consisten en una parte soluble (F_1) involucrada en la síntesis o hidrólisis de ATP y otra hidrofóbica (F_0) encargada de la translocación de protones. El complejo F_0F_1 tiene una masa molecular de aproximadamente 450 kD. La fracción soluble tiene cinco tipos de subunidades: la α de 50 a 60 kD, tres copias por F_1; la β de 50 a 60 kD, tres copias por F_1; la χ de 30 a 36 kD, una copia por F_1; la δ de menos de 20 kD, una copia por F_1, y la ε de menos de 20 kD, una copia por F_1. La fracción F_0 membranal tiene tres tipos de proteínas: una subunidad *a*, una subunidad *b* y diez copias de la subunidad *c*, que forman parte del canal de protones y contienen el sitio de unión del inhibidor diciclohexilcarbodiimida (DCCD). Las F-ATPasas se inhiben además con oligomicina, venturicina, trietilestaño, cadmio, agentes mercuriales y dietilestaño (DES).

Las F-ATPasas de la membrana plasmática de bacterias, de la membrana interna de la mitocondria y de los tilacoides del cloroplasto son análogas a las del tipo P y V descritas anteriormente, sólo que éstas funcionan en la dirección inversa: en lugar de que la hidrólisis de ATP impulse el transporte de iones, el gradiente de protones a través de la membrana genera la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato. El gradiente de protones se genera durante el transporte de electrones en el caso de la fosforilación oxidativa de las bacterias aeróbicas y en mitocondrias; o durante la fotosíntesis en el caso de los cloroplastos o por la bomba de protones activada por la luz (bacteriorrodopsina) como es en el caso de *Halobacterium*. La enzima que generalmente sintetiza el ATP (la ATP-sintasa) puede funcionar como las ATPasas transportadoras de iones, en ambas direcciones, dependiendo de las condiciones. Puede hidrolizar ATP y bombear H^+ a través de la membrana, o puede sintetizar ATP cuando los protones fluyen a través de la enzima en la dirección opuesta. Las ATP sintasas son las responsables de la síntesis de ATP en casi todas las células.

Las ATPasas de la superfamilia ABC

Las ATPasas de la superfamilia ABC transportan otras sustancias que no son protones ni iones inorgánicos.

En esta superfamilia se incluyen ATPasas que transportan otras sustancias que no son protones ni iones inorgánicos. A esta familia pertenecen las ATPasas transportadoras de la membrana plasmática de bacterias, de las cuales ya se han descrito alrededor de 50. Los sustratos transportados son de gran variedad e incluyen aminoácidos, azúcares, iones inorgánicos, polisacáridos, péptidos e incluso proteínas. Lo común entre los miembros de esta familia es que las proteínas consisten en dos mitades idénticas que se juntaron (duplicación en tándem). Cada mitad está compuesta por seis segmentos transmembranales arreglados en pares y un dominio citoplás-

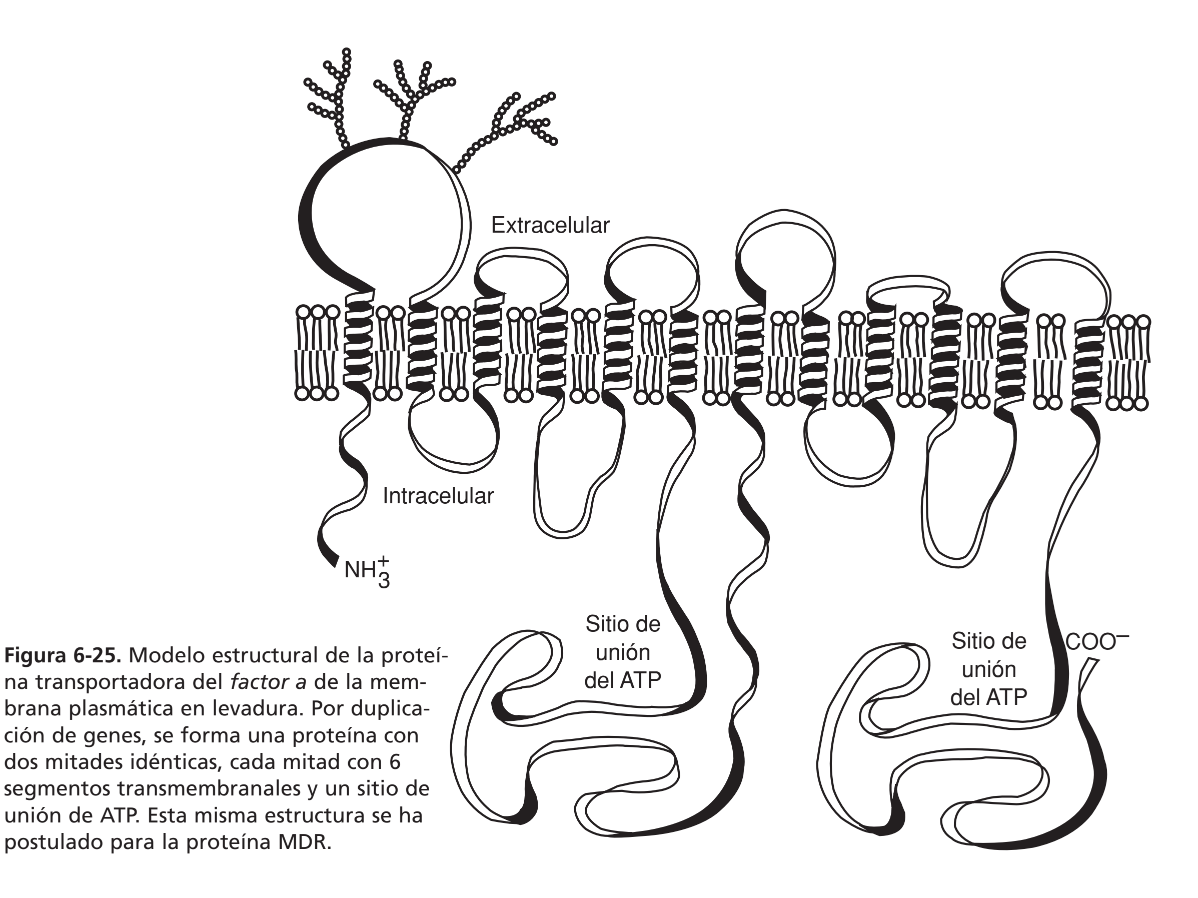


Figura 6-25. Modelo estructural de la proteína transportadora del *factor a* de la membrana plasmática en levadura. Por duplicación de genes, se forma una proteína con dos mitades idénticas, cada mitad con 6 segmentos transmembranales y un sitio de unión de ATP. Esta misma estructura se ha postulado para la proteína MDR.

mico conservado que contiene la secuencia consenso para la unión de ATP (figura 6-25).

La membrana plasmática de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene un sistema de transporte para el *factor a*, que es un péptido de 12 aminoácidos. El transporte de este péptido lo lleva a cabo una proteína de 1290 residuos de aminoácidos, que utiliza energía de la hidrólisis de ATP para exportar el *factor a* de la célula hacia el exterior (Featherson, 1990).

Otras proteínas similares al transportador del factor *a* se identificaron en una variedad de células tanto procariontes como eucariontes. Una de ellas es responsable de la adquisición de la resistencia a drogas en seres humanos. En algunos tratamientos de cáncer humano, se ha visto que con el tiempo el agente quimioterápico se vuelve ineficiente. Esta resistencia adquirida multidroga, o MDR, se extiende a una variedad de drogas que, sin embargo, tienen baja similitud estructural o funcional entre sí (Kartner y Ling, 1989).

Este fenómeno se debe a la expresión inducida de una glicoproteína de membrana de 170 kD conocida como la *glicoproteína-P* o la *ATPasa MDR*. Este sistema es probablemente un sistema sofisticado de protección para la célula y el organismo, gracias al cual ciertas moléculas orgánicas, que penetran a la célula por difusión, son excluidas activamente y que otorga a los animales la ventaja de poder nutrirse con ciertos vegetales que contienen sustancias que resultan tóxicas a sus competidores. Algunos agentes tera-

péuticos son reconocidos como invasores celulares y eliminados rápidamente de la célula. Aún no se entiende el mecanismo por el cual una proteína tan grande transporta moléculas de tan variada composición.

Otros miembros de esta familia son la proteína transportadora de cloroquina del protista *Plasmodium falciparum* y la proteína reguladora transmembranal de la fibrosis quística (CFTR), que funciona como un canal de Cl^- que requiere hidrólisis de ATP y de fosforilación dependiente de AMP cíclico.

Transporte activo impulsado por la luz

Ciertos procesos de transporte biológicos se impulsan por la energía de la luz en lugar de la de hidrólisis de ATP.

Ciertos procesos de transporte biológicos se impulsan por la energía de la luz en lugar de la de hidrólisis de ATP. Los dos sistemas mejor caracterizados son los de la *bacteriorrodopsina*, que es una bomba de H^+ impulsada por la luz y la *halorrodopsina*, que es una bomba de Cl^- propulsada por la luz (Oesterhelt y Tittor, 1989). Ambos sistemas fueron caracterizados en la arqueobacteria *Halobacterium halobium* que habita en aguas saladas con una concentración de NaCl de 4.3 M. Esta bacteria respira normalmente si hay suficiente oxígeno y nutrientes en el medio, pero, en condiciones en que faltan estos sustratos, la *H. halobium* sobrevive captando la energía de la luz por medio de la bacteriorrodopsina y la halorrodopsina.

La bacteriorrodopsina

La bacteriorrodopsina es una proteína transmembranal de 26 kD, que constituye 75% de las proteínas de membrana en el *Halobacterium halobium.* Está altamente empacada, formando un cristal bidimensional en el plano de la membrana. El análisis estructural revela siete hélices transmembranales y la molécula del retinal se encuentra 1 nm por debajo de la monocapa exterior de la membrana, en paralelo al plano de la membrana, formando una base de Schiff con el ε-NH_2 de la lisina, Lys^{216}, de cada molécula de bacteriorrodopsina.

El mecanismo de reacción del transporte de protones impulsado por la luz en la bacteriorrodopsina es complejo, pero se ha identificado una serie de intermediarios, nominados por la longitud de onda en nm de su espectro de absorción. La forma bR_{568} (en que la base de Schiff en la lisina 216 está protonada) absorbe un fotón de luz y convierte al retinal de la configuración todo-*trans* al isómero 13-*cis*. Al pasar por diferentes estados intermediarios, se transportan 2 iones de H^+ por cada fotón absorbido y el retinal regresa a su configuración *trans*. Parece ser que los protones transportados son los de la base de Schiff protonada. Así, el gradiente de protones generado es utilizado por la *Halobacterium halobium* para sintetizar ATP y para movilizar iones a través de la membrana celular. (figura 6-26)

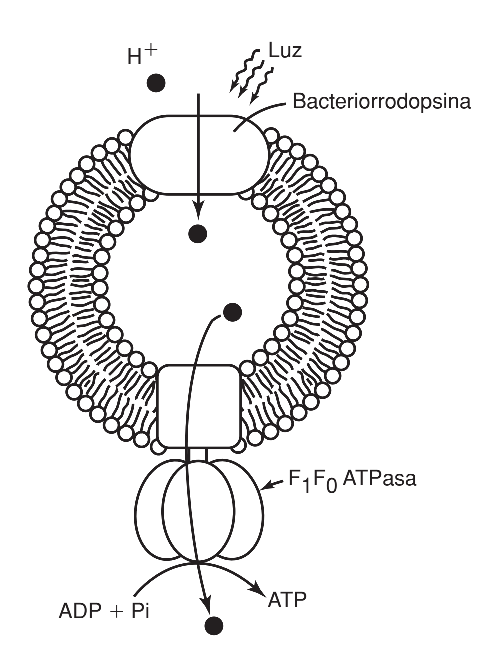


Figura 6-26. Reconstitución en liposomas de la bacteriorrodopsina. La bacteriorrodopsina reconstituida en sistema de membranas artificiales muestra que el transporte impulsado por la luz se puede utilizar por la ATP sintasa para sintetizar ATP.

El transporte de iones Cl^- al interior de la célula en *Halobacterium halobium* se lleva a cabo por una segunda bomba impulsada por la energía de la luz, la *halorrodopsina.* En forma similar a la bacteriorrodopsina, la halorrodopsina sufre cambios conformacionales dirigidos por la energía de la luz; sin embargo, no se desprotona la base de Schiff como en el fotociclo de la bacteriorrodopsina. La *Halobacterium halobium* cuenta con dos bombas de iones altamente homólogas, pero, mientras la bacteriorrodopsina bombea H^+ pero no Cl^-, la halorrodopsina bombea Cl^-, pero no H^+.

Transporte impulsado por gradiente de iones

El bombeo de las ATPasas y otras fuentes de energía crea gradientes de H^+, Na^+ y otros iones que los impulsa a regresar. El movimiento de regreso puede arrastrar otra sustancia en la misma dirección (por ejemplo, Na/Cl o Na/glucosa o Na/aminoácido) o bien un contra-ion que viaje en sentido opuesto (por ejemplo, Na^+ por H^+, K^+ por H^+, etc.). Como vemos, no se trata de un verdadero transporte activo, pues no están directamente acoplados a la fuente de energía metabólica. Se establecen así los co y contratransportes que ya hemos discutido. Pero, así y todo, se le llama transporte activo secundario, porque depende en último término del gradiente originado por la Na^+, K^+-ATPasa.

La *E. coli* tiene un sistema de *lactosa-permeasa* que transporta activamente lactosa hacia el interior de la bacteria, en compañía de un H^+ por cada lactosa transportada. Esta bomba obtiene la energía requerida para el transporte de lactosa de la *fuerza protón-motriz* a través de la membrana de la bacteria, compuesta por el gradiente de protones y por la diferencia en el potencial eléctrico entre ambos lados de la membrana, que a su vez es el resultado de los procesos de respiración de la bacteria (Kaback y cols*.,* 1990).

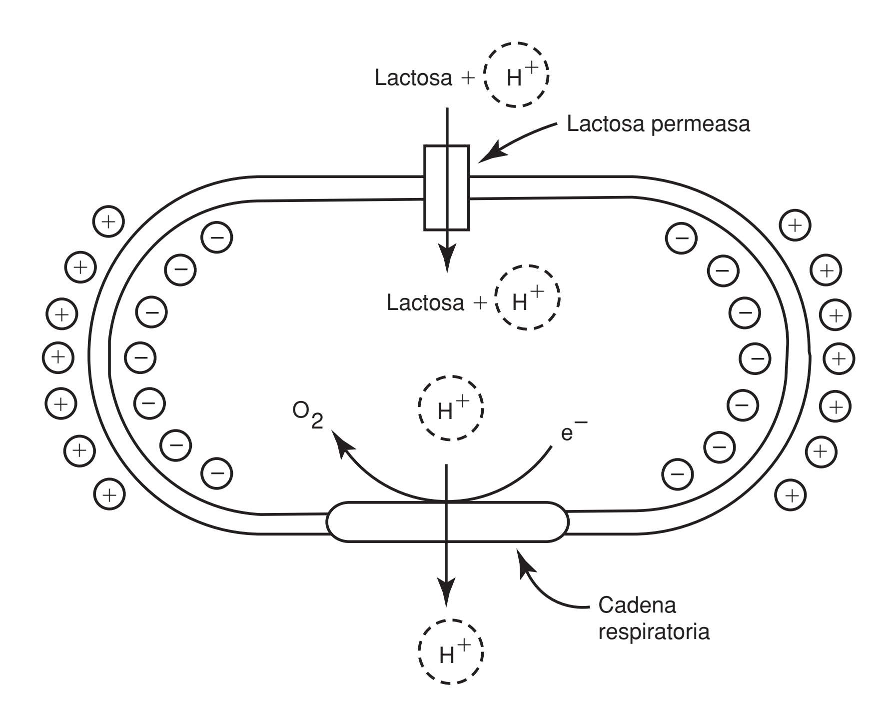


Figura 6-27. La lactosa permeasa en la membrana de *E. coli.* El flujo de electrones en la cadena respiratoria genera un gradiente de protones, que se utiliza por la lactosa permeasa para transportar lactosa hacia el interior de la célula. Se indica el potencial eléctrico de la membrana.

La proteína lactosa-permeasa, reconstituida en vesículas fosfolipídicas, es capaz de transportar lactosa y H^+ en forma de *simporter* si se establece un gradiente de pH a través de la membrana vesicular (figura 6-27). El estudio estructural de la proteína membranal de 47 kD revela la existencia de doce hélices transmembranales. El sitio de unión de la lactosa se localiza en una porción proteica embebida en la membrana. Los aminoácidos His^{322} y Glu^{325} de la permeasa son los que se protonan y desprotonan durante el transporte del azúcar, lo que sugiere que son los responsables del transporte de protones en el mecanismo *simport*.



Canales iónicos

Son proteínas que funcionan como poros, a través de los cuales los iones pueden atravesar la membrana plasmática impulsados por sus gradientes electroquímicos. Hay en la naturaleza una enorme diversidad de canales y su presencia es ubicua en todo tipo de células, eucariótica o procariótica, animal o vegetal, y no están limitados a células excitables como inicialmente se supuso.

Los canales iónicos funcionan como poros, a través de los cuales los iones pueden atravesar la membrana plasmática impulsados por sus gradientes electroquímicos.

Aún estamos muy lejos de comprender, sin embargo, qué papel fisiológico desempeña cada uno de estos tipos de canales iónicos, salvo en algunos casos, como en el de la excitabilidad, que es la generación y propagación del impulso nervioso. Si bien a nivel molecular todos los diversos tipos de canales realizan una misma función, que es la de permitir el paso de iones, en el contexto de la fisiología celular, los canales iónicos están involucrados, por ejemplo, en la división celular, en el reconocimiento celular, en el equi-

librio electroquímico, entre otros. A nivel metacelular, los canales iónicos, además de la excitabilidad, participan en procesos como la memoria, el ritmo cardiaco, la integración neuronal, la locomoción, etcétera.

Componentes funcionales de los canales iónicos

Algunos componentes funcionales son comunes a todos los diferentes tipos de canales (figura 6-28): 1) *un poro acuoso*, a través del cual los iones pueden fluir de uno a otro compartimento que separa la membrana plasmática; 2) *un filtro de selectividad*, con el cual los canales pueden identificar y discriminar entre los distintos tipos de iones fisiológicamente importantes, como son el Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^-; la capacidad de discriminar es muy variable, algunos canales discriminan casi perfectamente el sodio del potasio, o viceversa, mientras que existen otros que no discriminan entre cationes; esta propiedad de selectividad identifica a un canal iónico; así, existen canales de Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^-; 3) *una compuerta*, que limita el flujo de los iones a través del poro, independientemente del gradiente electroquímico que los impulsa; esta compuerta se abre y se cierra de manera aleatoria, aunque su probabilidad de apertura está influida por factores del microambiente, tales como el voltaje transmembranal o la presencia o ausencia de ciertas moléculas, tales como neurotransmisores, ATP u otros iones (Hille, 1992).

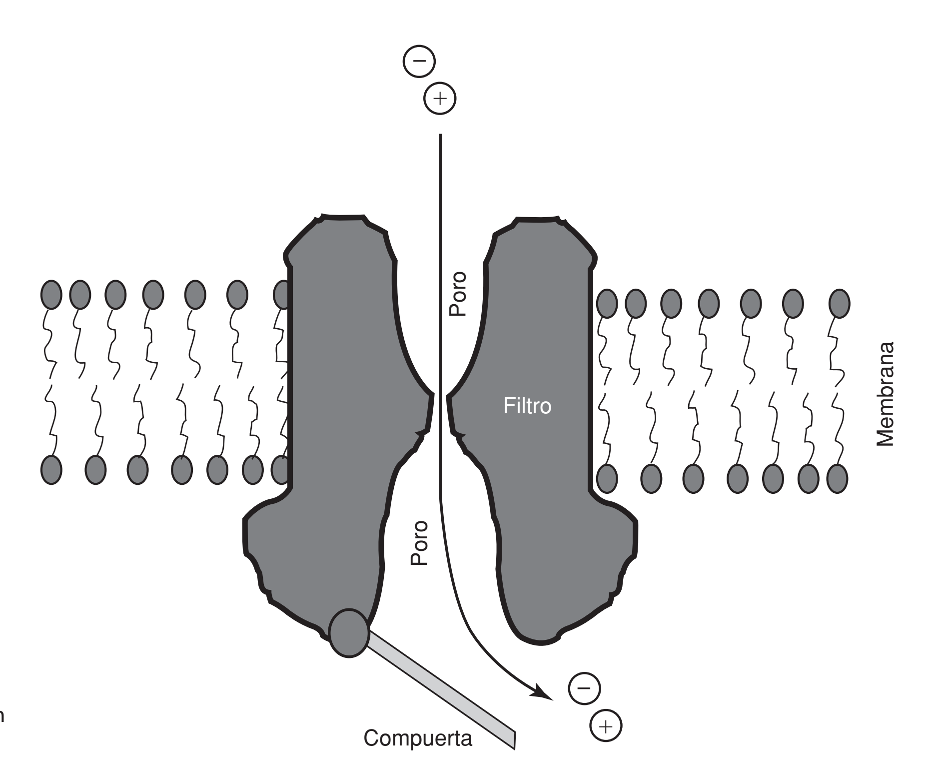


Figura 6-28.
Esquema funcional de un canal iónico.

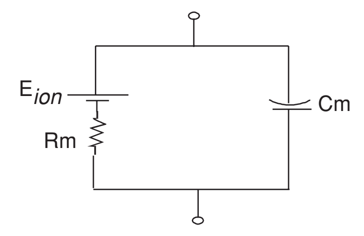
El flujo de iones a través de los canales constituye una corriente eléctrica cuya magnitud y cinética se pueden estudiar utilizando aparatos electrónicos, primeramente para amplificar la señal y después para procesarla y registrarla. Ésta es la razón de que el estudio de canales iónicos requiera que recordemos aquí algunos conceptos y técnicas electrofisiológicas; el más fundamental de ellos es la ley de Ohm:

$$I = g \cdot E$$

Donde I es la corriente en amperios, g es la conductancia en siemens y E es el potencial eléctrico transmembranal en volts.

Así, en su forma más simple, los canales iónicos se pueden modelar considerándolos en un circuito eléctrico, como una resistencia, o su inversa que es la conductancia. Cada canal inserto en la membrana tiene su propia conductancia unitaria (g_i). Si todos los canales son de un mismo tipo, la conductancia total de membrana (g_m) de una célula es la suma de las conductancias unitarias de los (n) canales abiertos.

Además, es necesario considerar la membrana celular como un capacitor que separa el medio citoplasmático del exterior celular. Este capacitor está arreglado en paralelo con la resistencia, de manera que el modelo eléctrico de membrana es el siguiente:



El gradiente electroquímico que impulsa los iones a través de los canales depende de la diferencia de concentración en ambas caras de la membrana y de gradiente eléctrico, o la diferencia de potencial entre el interior y el exterior celular. Cuando el gradiente químico y el eléctrico se encuentran en equilibrio, los iones no fluyen a través de los canales, aunque éstos se encuentren abiertos. Éste es el potencial de reposo (E_{ion}), que se puede calcular con la ecuación de Nernst como sigue:

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[\text{ion}]_{ext}}{[\text{ion}]_{ion}}$$

El potencial de reposo es distinto para cada especie iónica, el sentido y la magnitud del flujo a través de los canales, depende de la diferencia entre el potencial de membrana y el potencial de reposo para un cierto ion, como lo describe el siguiente modelo:

$$I_{ion} = g_{ion} \cdot (E_m - E_{ion})$$

La corriente total de membrana, que se puede medir en un momento dado, es igual a la corriente capacitiva, más la corriente iónica.

Siendo la corriente capacitiva:

$$I_{cap} = Cm \cdot \frac{dV}{dt}$$

a su vez la corriente iónica es la suma de las corrientes debidas a cada especie iónica, por lo que, una ecuación más general que describe la corriente de membrana es:

$$\text{Im}(t) = Cm \cdot \frac{dV}{dt} + I_{Na} + I_K + I_{Ca} + I_{Cl}$$

Esta ecuación nos indica que para estudiar la corriente iónica de la membrana, es necesario eliminar la corriente capacitiva. Esto se logra sólo si el potencial de membrana se mantiene constante, ya que en esas condiciones dV/dt = 0. Esta condición se puede cumplir fijando el voltaje con un circuito electrónico muy veloz, que sea capaz de determinar en un momento dado el potencial transmembranal e inyectar la corriente necesaria para poder mantener el potencial en el valor deseado, llamado "potencial de mantenimiento". Un circuito electrónico fue diseñado inicialmente por Robert Cole, en la década de 1940, y posteriormente aplicado por Hodgkin y Huxley (1952) quienes estudiaron el fenómeno de excitabilidad de la membrana en el axón gigante de calamar. Hodgkin y Huxley pudieron describir la cinética de las corrientes de Na^+, K^+ y Cl^-, y proponer un modelo que se ajustó con mucha precisión en sus observaciones. Posteriormente, el estudio de los fenómenos electrofisiológicos estuvo limitado, por mucho tiempo a preparaciones biológicas con características geométricas extraordinarias, como el axón de calamar, las fibras musculares, o axones de caracol, que por su grueso calibre permitían la introducción de electrodos para medir el potencial de membrana e inyectar corriente.

La técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch clamp*)

La técnica de fijación de membrana en microáreas de membrana o "patch clamp". es una técnica que permitió resolver la corriente producida por un solo canal.

Neher y Sakmann (1976) inventaron la técnica de fijación de membrana en microáreas de membrana o *patch clamp*. Esta técnica permitió resolver la corriente producida por un solo canal y extendió su estudio a casi todo tipo de célula, sin importar sus caracterísicas geométricas. Consiste fundamentalmente en usar una pipeta de vidrio que forma un sello de muy alta resistencia con la membrana aislando eléctricamente el parche de membrana que se encuentra en la punta. Existen diferentes modalidades, como se ilustra en la figura 6-29. Cuando la pipeta sella la membrana celular, constituye la modalidad "sobre la célula", o *cell attached*, que es útil para registrar corrientes unitarias de canales que dependen de sustancias presentes en el citoplasma, como ATP, IP3, proteínas G, etc. A través de la misma pipeta se puede dar una succión fuerte, con lo que la membrana que limita la pipeta se rompe, lográndose una continuidad entre el medio de la pipeta y el interior de la membrana. Esta modalidad de

"célula entera" (*whole cell*), permite registrar todos los canales de la membrana plasmática. A partir de esta modalidad de "célula entera" se puede pasar a la modalidad de "membrana invertida" (*outside out*), con la cara externa de la membrana orientada hacia el medio que rodea a la pipeta, tiene la ventaja sobre la de "sobre la célula", en que el voltaje transmembranal se puede controlar con precisión, así como las condiciones iónicas del medio en contacto con ambas caras del parche de membrana. Esta condición es útil cuando se quiere ensayar el efecto de bloqueadores que actúan por afuera de la membrana. Una última modalidad para registrar canal unitario se logra partiendo de "sobre la célula", retirando gradualmente la pipeta hasta quedar con el parche orientado con el lado citoplásmico hacia el medio, esta configuración de "membrana orientada", o *inside out*, es útil para ensayar sustancias que actúan sobre los canales desde la parte interna.

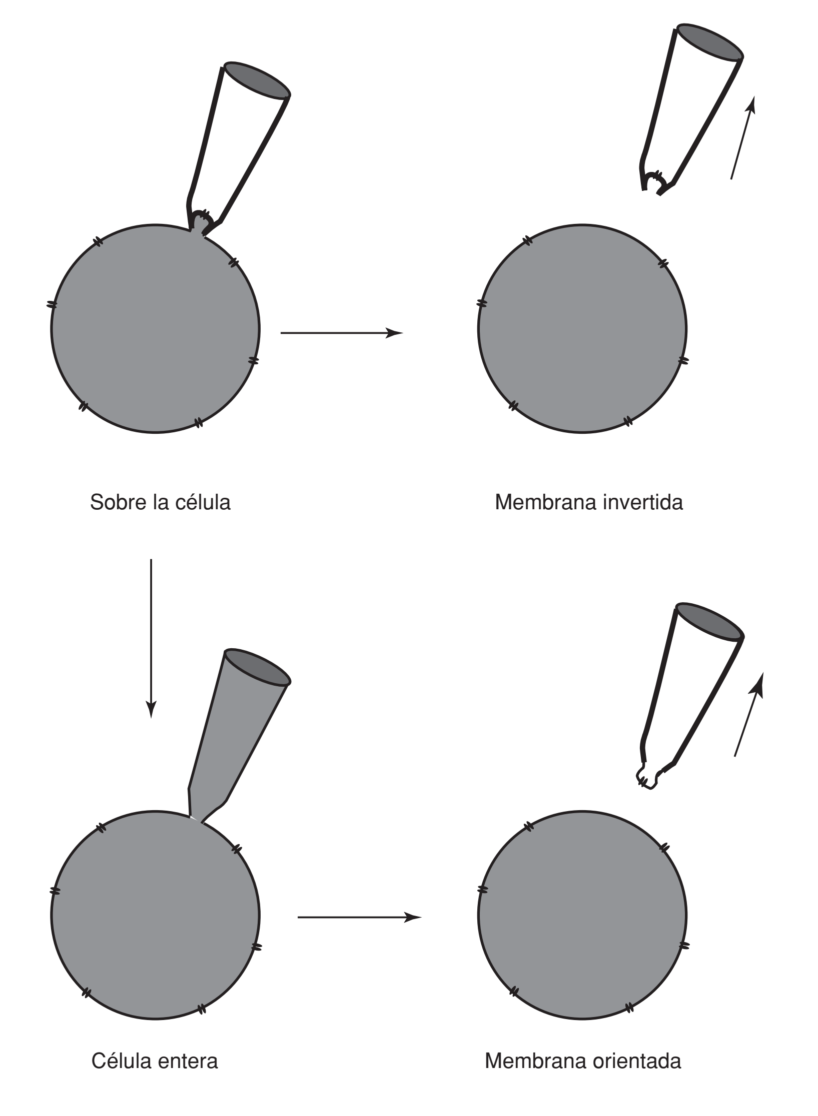


Figura 6-29. Esquema que representa las diversas modalidades de la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch clamp*).

Diversidad funcional y molecular de los canales iónicos

Utilizando conceptos y técnicas puramente electrofisiológicas se pudo ampliar enormemente el conocimiento de los canales iónicos, tanto de su diversidad como de sus propiedades funcionales. Ya desde la época de Hodgkin y Huxley se sabía que algunos tipos de canales son dependientes del voltaje, porque al construir una gráfica de I_m, versus V_m, la relación no es lineal, sino que la pendiente, que corresponde a gm aumenta a medida que se incrementa el voltaje, como se ilustra en la figura 6-30.

Bajo condiciones de fijación de voltaje es posible mantener el potencial de membrana en un valor constante, e incluso cambiarlo de uno a otro valor. Al cambiarlo, la corriente iónica cambia de una manera exponencial de un estado estacionario a otro (**activación**), como se describe en la figura 6-31, y su rapidez se puede describir cuantitativamente con una constante de tiempo que varía entre los distintos tipos de canales iónicos. Para los canales dependientes del voltaje, esta constante de tiempo varía en función del potencial transmembranal. Cuando el potencial de membrana regresa a su valor original, la corriente adopta su valor estacionario original, pasando por un proceso exponencial; éste es el proceso de desactivación, cuya constante de tiempo puede ser diferente de la de activación. Hay algunos tipos de canales cuya activación no sigue un proceso exponencial simple y, aun

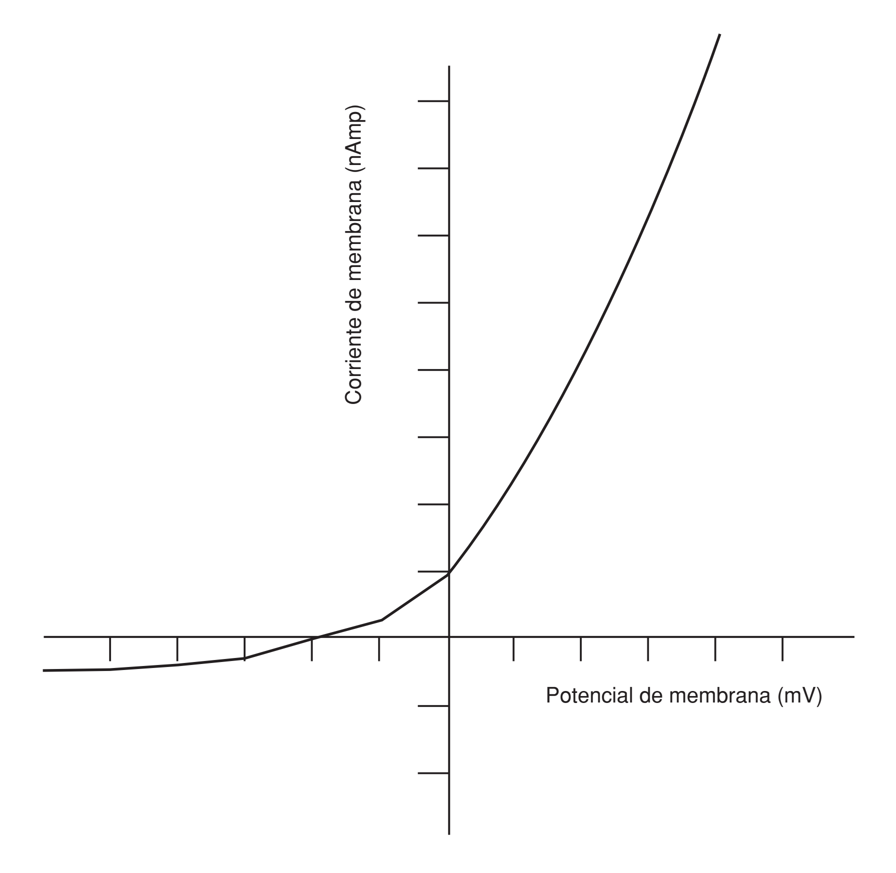


Figura 6-30. Relación corriente vs. voltaje de membrana, que se obtiene de membranas biológicas bajo condiciones de fijación de voltaje, al estimular la membrana con una serie de pulsos despolarizantes y registrando la corriente en el estado estacionario para cada uno de esos valores. La relación no es lineal, y su pendiente se incrementa a potenciales más despolarizantes.

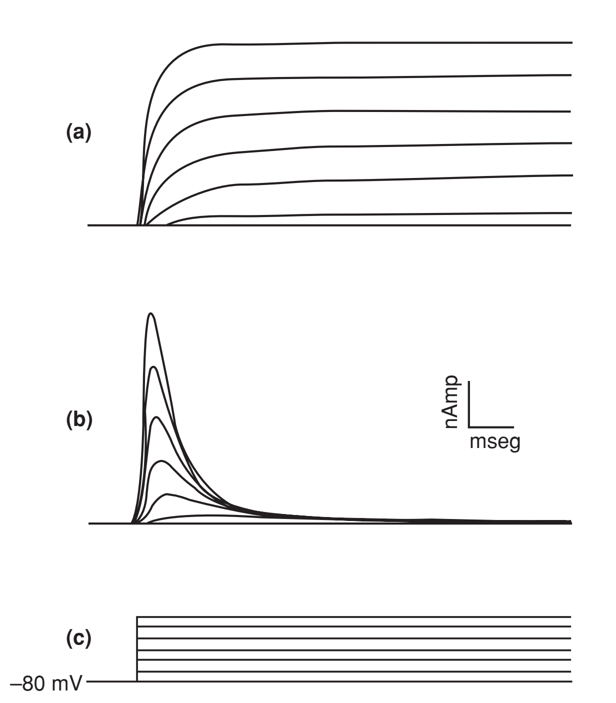


Figura 6-31. Series de corrientes iónicas que se obtienen en condiciones de fijación de voltaje, en respuesta a una serie de pulsos de voltaje. **a)** Serie de corrientes obtenidas de un ovocito de rana inyectado con mRNA de un canal de potasio Kv3.1b, que muestran la activación de las corrientes; éstas alcanzan un estado estacionario diferente para cada potencial. **b)** Serie de corrientes de un ovocito inyectado con mRNA de canales de potasio *shaker*. Las corrientes disminuyen de magnitud, aun cuando el pulso de voltaje se mantiene constante (inactivación). **c)** Cambios en el potencial de membrana con el que se estimularon las células para obtener las corrientes del **a)** y **b)**. Se partió de un potencial de mantenimiento de –80 mV.

cuando el potencial de membrana se mantiene constante, disminuyen transitoriamente en función del tiempo y del voltaje transmembranal (figura 6-31a, inactivación), que es característica de algunos tipos de canales de Na^+, de K^+ y de Ca^{2+}.

Las corrientes iónicas de un solo canal aparecen como transiciones entre dos o varios niveles de corriente. Uno de ellos corresponde al estado abierto del canal, y existe al menos un estado cerrado. Estas transiciones son aletorias, pero la probabilidad de que ocurran depende de factores externos, como son el voltaje transmembranal, la presencia de agentes químicos o la tensión mecánica. A partir de estos datos, se puede obtener una gran cantidad de información de los canales; por ejemplo, la magnitud de las transiciones de corriente nos puede dar información de la conductancia unitaria, si se hace una relación entre el voltaje de membrana y la magnitud de la corriente, como se muestra en la figura 6-32. Esta relación es ge-

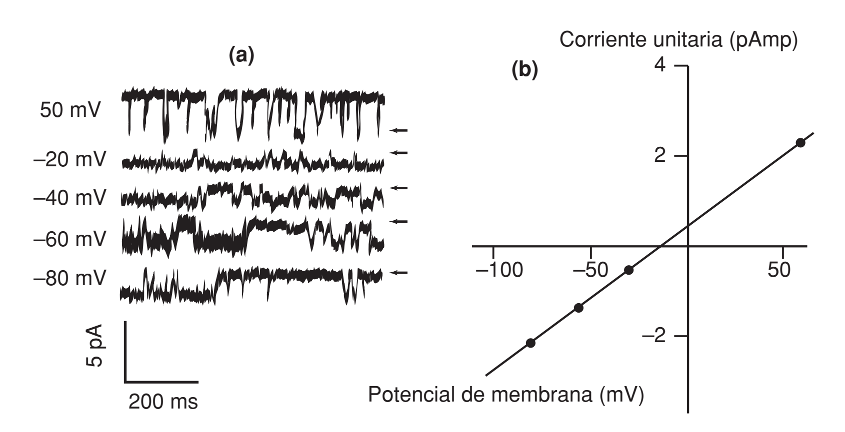


Figura 6-32. Corrientes unitarias. **a)** Serie de corrientes obtenidas de una célula epitelial en cultivo usando la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana, en la modalidad de "sobre la célula". **b)** Relación corriente-voltaje obtenida de los datos que se muestran en **a**; cada punto representa la magnitud de la corriente que se calcula considerando la diferencia entre los dos niveles, uno de los cuales corresponde al estado abierto del canal y otro al cerrado (Ponce y cols., 1991).

neralmente lineal, y su pendiente es la conductancia unitaria, aunque existen canales que no observan una relación lineal, y siguiendo la terminología de ingeniería, se dice que rectifican.

La gran diversidad de canales se puede destinguir por la gama de selectividades a Na^+, K^+, Ca^{2+}, o Cl^-, dependencia del voltaje o de agentes químicos, propiedades cinéticas macroscópicas o unitarias, que sirvieron para distinguirlos y clasificarlos. Existen diversas familias de canales para cada uno de los iones de interés fisiológico, reconocibles desde el punto de vista funcional, como son los canales de Na^+, Ca^{2+} o K^+ dependientes del voltaje, canales de K^+ rectificadores entrantes, canales de K^+ dependientes de ATP, canales de K^+ dependientes de Ca^{2+}, por nombrar sólo algunos ejemplos.

Se han podido clonar y secuenciar diversos genes que codifican para canales iónicos, a partir de lo cual se ha deducido la secuencia primaria de aminoácidos y se han podido predecir sus estructuras secundaria y terciaria, y su conformación en la matriz lipídica.

En los últimos años se han podido clonar y secuenciar diversos genes que codifican para canales iónicos, a partir de lo cual se ha deducido la secuencia primaria de aminoácidos y se han podido predecir sus estructuras secundaria y terciaria, y su conformación en la matriz lipídica. Posteriormente, se han utilizado sistemas de expresión heterólogos, como el de ovocitos de sapo *Xenopus leavis*, en los que se inyecta con una micropipeta el RNA mensajero, sintetizado *in vitro*, que codifica para un cierto canal iónico. El ovocito es capaz de traducirlo y expresarlo funcionalmente en la membrana, como se ilustra en la figura 6-33. Haciendo mutaciones, o deleciones y observando como alteran éstas las propiedades funcionales del canal, se ha

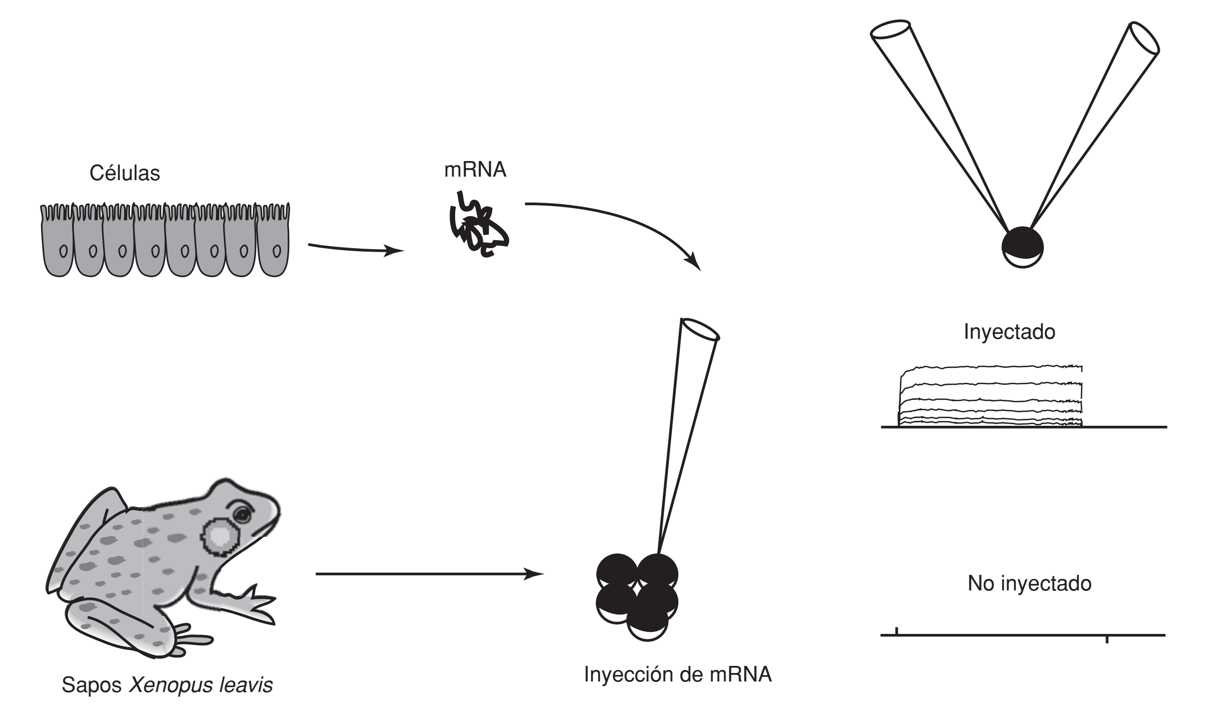


Figura 6-33. Técnica de expresión de canales iónicos en ovocitos de rana. Los ovocitos maduros de sapos sudafricanos *Xenopus leavis*, son capaces de expresar diversas proteínas de membrana, como canales iónicos, cuando se inyectan con RNA mensajero. Este RNA puede ser sintetizado *in vitro*, o bien, purificado a partir de preparaciones biológicas, como células en cultivo o tejidos.

aprendido que partes de la secuencia son responsables de los distintos componentes funcionales, como son el poro acuoso, el sensor de voltaje o la compuerta de inactivación.

Una vez determinada la secuencia de un canal, también es posible saber su distribución en los distintos tejidos, o en qué partes de la membrana celular se localiza. Esto se logra usando anticuerpos muy específicos, o detectando la presencia del mRNA mediante ensayos de Northern blot, o por hibridación *in situ*. En ambos casos se sintetiza un fragmento de DNA, complementario a un segmento del mRNA, cuya secuencia ya es conocida. El fragmento está marcado radiactivamente y revela la presencia del mRNA. En el *Northern blot* se reconoce al mRNA en un gel de poliacrilamida y en la hibridación *in situ* en muestras histológicas.

Canales de K

Canales de K dependientes del voltaje

El primer canal que se clonó y secuenció fue el *Shaker* de *Drosophila*, denominado así porque se detectó de una cepa de *Drosophilas* que tiemblan cuando se las duerme con éter (Papazian y cols., 1991). Al comparar las corrientes iónicas de células musculares, se encontró que la cepa *Shaker* carece de una corriente transitoria de potasio, denominada "corriente A". Esto llevó a los genetistas a comparar el genoma de las moscas *shaker* con las normales y encontrar el gen que codifica para canales de potasio dependientes de voltaje, a los que se denominó *Shaker*. Cuando se inyecta el RNA mensajero, sintetizado *in vitro* a partir de este gen en ovocitos de rana, se producen corrientes de K con características cinéticas similares a la corriente A. Al analizar el perfil hidrofóbico de los residuos de aminoácidos traducidos, se dedujo que la secuencia peptítica debía atravesar seis veces la membrana (S1-S6), con sus segmentos terminales orientados hacia la cara interior (figura 6-34). También se ha demostrado que la región N terminal

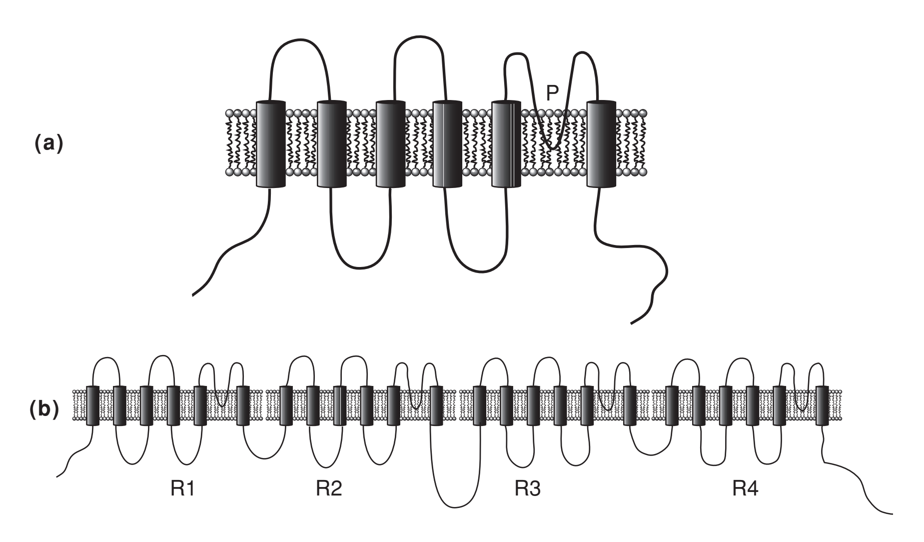


Figura 6-34. Topología de los canales iónicos dependientes del voltaje. **a)** Topología de una subunidad de los canales de K^+ dependientes del voltaje, que atraviesa seis veces la membrana, con sus dos terminales orientadas hacia el lado citoplásmico; la porción P constituye el poro del canal. **b)** Se requieren cuatro de estas subunidades para ensamblar un canal de K^+, mientras que en los canales de Na^+ y de Ca^{2+}, las cuatro subunidades ya están enlazadas en una sola secuencia, R1- R4.

forma una bola que tapa el poro del canal desde la cara intramembranal, inactivándolo. El poro acuoso lo constituye una región parcialmente embebida en la membrana, comprendida entre los segmentos transmembranales S5 y S6. El segmento transmembranal S4 es el responsable de la dependencia del voltaje de este tipo de canales. A partir de la secuencia del *Shaker*, se identificaron tres genes distintos en *Drosophila*, que también codifican para canales de K dependientes de voltaje, a los que se denominó *Shab*, *Shaw* y *Shal*, respectivamente. Cada uno de ellos produce por procesamiento alternativo (*splicing*) dos o más tipos de canales. Además, en experimentos con ovocitos, se ha comprobado que las subunidades de una misma familia se pueden combinar para formar los complejos tetraméricos, lo cual incrementa enormemente la diversidad de canales de K dependientes de voltaje. Por homología también se han encontrado una variedad de canales de K^+ en mamíferos, como rata, ratón y humano, que son muy similares a los distintos canales de K^+ de *Drosophila*. Los canales de K^+ de mamífero tipo *Shaker* se han denominado Kv1; los de *Shab,* Kv2; los de *Shaw,* Kv3; y los de *Shal*, Kv4.

Canales de K dependientes de Ca^{2+}

Hay una variedad de canales que depende del calcio intracelular más que del voltaje.

Hay una variedad de canales que depende del calcio intracelular más que del voltaje. Como en el caso de la mutante Shaker, se identificó una cepa de *Drosophila* que no expresan este tipo de canales, a la que se denominó *slowpoke*, y por comparación se logró identificar el *locus* y, posteriormente, el gen que codifica para este tipo de canales de K^+ que resultan ser dependientes de Ca^{2+}, o Maxi-K, por su gran conductancia. El análisis de hidropatía reveló que su topología es similar a la de los canales dependientes del voltaje, con siete segmentos transmembranales, y una región determinante del poro acuoso similar a los canales de K^+ y de Na^+.

Canales de K^+ rectificadores entrantes

Este tipo de canales de K^+ actúa como una válvula que permite la entrada de iones de K^+, pero no la salida, y son muy importantes para mantener el potencial de reposo celular. En las neuronas determinan la frecuencia de disparo y, en el corazón, desempeñan un importante papel en las propiedades de marcapaso. A diferencia de los canales dependientes del voltaje, las subunidades de los rectificadores entrantes constan de sólo dos segmentos transmembranales, M1 y M2. Estos canales también se conforman de cuatro subunidades, que cuando se combinan producen canales rectificadores entrantes dependientes de proteínas G. Se han encontrado hasta el momento cuatro diferentes familias, denominadas Kir1, Kir2, Kir3 y Kir4; esta última es insensible a las proteínas G.

MinK

El gen que codifica para este tipo de canales fue aislado primeramente de riñón de rata, pero se ha encontrado también en otros tejidos, como corazón y útero. Cuando se expresan en ovocitos de rana, producen una corriente de activación muy lenta, del orden de minutos. Consta solamente de 130 residuos de aminoácidos y su perfil hidropático indica que atraviesa la membrana solamente una vez. Su estequiometría no está bien definida, pero experimentos con ovocitos sugieren que se forman con dos subunidades de MinK y otra subunidad desconocida, no minK.

Canales de Na^+

Los canales de Na^+ dependientes del voltaje son menos diversos que los de K^+, tanto funcional, como molecularmente. En realidad se ha visto que los canales de Na^+ se contituyen como un complejo formado por una subunidad principal α y dos subunidades más pequeñas, β_1 y β_2. Inicialmente, el grupo de Numa (Noda y cols., 1984) clonó la subunidad α del canal de Na^+. Su secuencia se forma de cuatro porciones casi idénticas, cada una de las cuales tiene notables semejanzas con la topología de los canales de K^+ dependientes del voltaje, como son seis segmentos transmembranales, y una porción parcialmente embebida entre los segmentos 5 y 6 que constituye el poro acuoso; el segmento S4 está muy conservado entre los canales de Na^+ de distintas especies, y es muy similar al correspondiente de K^+. Usando estrategias de mutagénesis dirigida, se ha demostrado que esta región confiere al canal su dependencia del voltaje. También se ha encontrado que el segmento que enlaza las repeticiones III y IV es la responsable de la inactivación característica de estos canales. Numa y sus colaboradores también clonaron un tipo de canal de Calcio (Ca^{2+}) dependiente del voltaje, el receptor de dihidropiridina, y encontraron que tiene homología estructural con los canales de Na^+ y los de K^+, por lo que ahora se piensa que todos los canales dependientes del voltaje pertenecen a una misma familia, que evolucionaron a partir de un ancestro común, muy probablemente un canal de K^+.

Los canales de Na^+ dependientes del voltaje son menos diversos que los de K^+, tanto funcional, como molecularmente.

Los canales dependientes del voltaje pertenecen a una misma familia, que evolucionaron a partir de un ancestro común, muy probablemente un canal de K^+.

Perspectivas en el estudio de canales iónicos

Si bien las técnicas modernas han ampliado enormemente nuestro conocimiento de la diversidad y estructura de los canales iónicos, su función en las células no es bien comprendida y constituye un reto para la investigación en el futuro inmediato. Está claro, sin embargo, que, por ser estas proteínas de membrana que desempeñan una función tan crucial como el equilibrio iónico en la membrana, el estudio de su funcionamiento va más allá de la investigación básica. Se han descrito varias enfermedades en las cuales los canales iónicos participan directamente, como la fibrosis quística,

La fibrosis quística se debe a un mal funcionamiento de un tipo de canal de cloro.

que se debe a un mal funcionamiento de un tipo de canal de cloro, y se han encontrado casos en que los canales de potasio desempeñan un papel fundamental en el desarrollo; por ejemplo, se ha identificado que una sola mutación de un tipo de canal de potasio de rectificación entrante ocasiona que ratones que padecen esta mutación crezcan casi completamente sin cerebelo.

La membrana es una entidad dinámica

Nada está más alejado de la realidad que la idea de una membrana estática y estable. Continuamente la membrana está incorporando nuevos componentes (lípidos, proteínas) y retirando otros que ya no se necesitan o están dañados. Por ejemplo, durante el ciclo celular, la membrana duplica su tamaño antes de la división celular; en el transcurso de la diferenciación, cada tipo celular incorpora los componentes que le son característicos y retira los que no lo son y, por si esto fuera poco, cotidianamente las células enfrentan un medio cambiante al que se adaptan incorporando o quitando componentes para adaptarse a él.

Durante el ciclo celular, la membrana duplica su tamaño antes de la división celular.

La incorporación de componentes se lleva a cabo por fusión *exocítica*, de vesículas intracelulares que llevan pequeñas unidades de membrana ensamblada. La eliminación de componentes se lleva a cabo por *endocitosis*, proceso en el que la membrana hace una pequeña invaginación que termina por constituir una vesícula que se separa. Es necesario un balance preciso entre la endocitosis y la fusión exocítica para que la célula mantenga su membrana con el tamaño y composición característicos. Veamos algunos ejemplos.

El Glut4 y la homeostasis de glucosa

Depués de una comida, la glucosa de los alimentos es transportada a la sangre por mecanismos como los descritos en la sección de acarreadores. Como resultado, los niveles sanguíneos de glucosa suben. Esto constituye la señal para que las células beta de los islotes de Langherhans de páncreas activen ciertos canales iónicos, exociten vesículas cargadas de insulina y viertan la hormona a la sangre. Los tejidos que consumen mucha glucosa, como el muscular y el adiposo, expresan el *uniport* de glucosa Glut4, localizado, principalmente, en vesículas de la red transtubular del aparato de Golgi. Cuando la insulina aumenta en la sangre, los receptores de los miocitos y los adipocitos la unen y, a través de una cadena de reacciones intracelulares que incluyen múltiples fosforilaciones, induce la fusión exocítica de las vesículas con Glut4. En consecuencia, al haber más acarreadores en la membrana, aumenta el influjo de glucosa y, en poco tiempo, disminuye su concentración en la sangre para alcazar los niveles normales (figura 6-35).

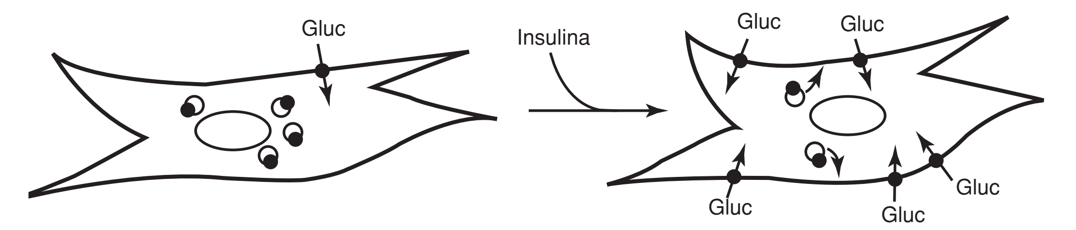


Figura 6-35. Desplazamiento del Glut4 intracelular a la membrana celular. El transportador se encuentra en vesículas intracelulares en la red transtubular del aparato de Golgi. La insulina dispara el mecanismo de fusión exocítica que incorpora los transportadores a la membrana plasmática.

Los canales de agua en el riñón

Cuando el organismo pierde agua y sufre hemoconcentración, la hipófisis responde segregando hormona antidiurética (ADH). Al llegar al riñón, esta hormona hace que la reabsorción de agua sea mayor, minimizando así su pérdida por la orina. Las células de la porción distal de la nefrona se especializan en recuperar el agua que se filtra con la orina, pues poseen, justo por debajo de la membrana apical, una intrincada red de vesículas con canales de agua ya sintetizados. Ante el estímulo de la ADH, estas células responden fusionando las vesículas a la membrana apical. Los canales se incorporan a la membrana plasmática, aumenta la permeabilidad al agua, se transporta al interior celular primero y luego al intersticio y a la sangre (figura 6-36).

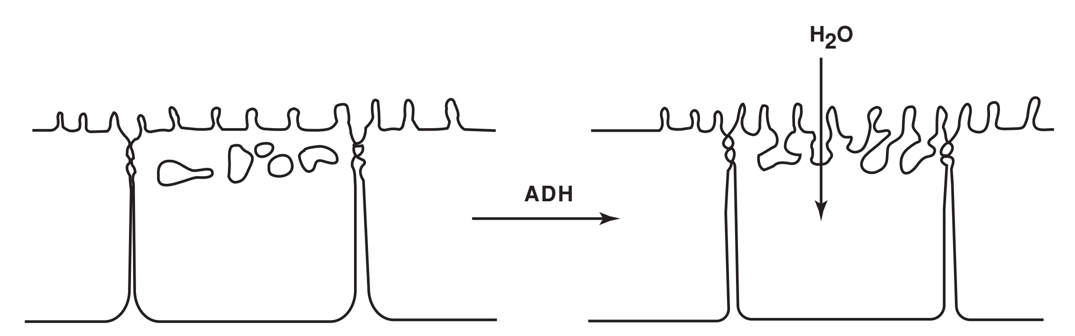


Figura 6-36. Incorporación de canales de agua a la membrana celular. En las células del túbulo distal, la hormona ADH dispara la fusión de vesículas apicales con los canales de agua.



Referencias bibliográficas

Alper, S.L., "The band 3-related anion Exchanger (AE) Gene Family", *Ann. Rev. Physiol.,* **53:** 549-564, 1991.

Altendorf, K. y Epstein, W., "Kdp-ATPase of Escherichia coli, Cell Physiol.", *Biochem.,* **4:** 160-172, 1994.

Appel, C.; Gloor, S.; Schmalzing, G.; Schachner, M. y Bernhardt, R.R., "Expression of a Na^+, K^+-ATPase Beta3 Subunit During Development of the Zebrafish Central Nervous System", *J. Neurosci. Res.,* **46:** 551-564, 1996.

Cereijido, M., *Tight Junction,* CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992.

——— y Rotunno, C.A., *An Introduction to the Study of Biological Membranes*, Gordon & Breach, Londres, 1970.

Featherson, C., "An ATP-driven pump for secretion of yeast mating factor", *Trends in Biochem. Sci.,* **15:** 169-170, 1990.

Forbrush, B., III, en *Current Topics in Membrane and Transport,* Hoffman, J.F. y Forbbush B., III, eds., Academic Press, Nueva York, **19:** 167-201, 1983.

Gould, G.W. y Holman G.D., "The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression", *Biochem.* J., **295:** 329-341, 1993.

Henderson, P.J.F., "The 12-transmembrane helix transporters", *Current Opinion in Cell Biology,* **5:** 708-721, 1993.

Hille, B., *Ion channels of excitable membranes,* 2a. ed., Edit. Sinauer, 1992.

Hodgkin, A.L. y Huxley, F., "Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo", *J. Physiol.,* **116:** 449-472, Londres, 1952.

Ikemoto, S.; Thompon, K.S.; Itakura, H.; Lane, M.D. y Ezaki, O., "Expression of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice: effect of exercise and role in glucose homeostasis", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **92:** 865-869, 1995.

Inesi, G.; Sumbilla, C. y Kirtley, M., "Relationships of molecular structure and function in Ca^+-transport ATPase", *Physiological Reviews,* **70:** 749-759, 1990.

James, D.E. y Piper, R.C., "Insulin resistance, diabetes, and the insulin-regulated trafficking of GLUT-4", *J. Cell Biology,* **126-5:** 1123-1126, 1994.

Jorgensen, P.L. y Andersen, J.P., "Structural basis for E1-E2 conformational transitions in Na, K-pump and Ca-pump proteins", *J. of Membrane Biology,* **103:** 95-120, 1988.

Kaback, H.R., Bibi, E. y Roepe, P.D., "β-Galactoside transport in E. coli: A Functional dissectional of lac permease", *Trends in Biochem. Sci*., **15:** 309-314, 1990.

Kartner, N. y Ling, V., "Multidrug resistance in cancer", *Scientific American,* **260:** 44-51, 1989.

Katz, E. B.; Stenbit, A.E.; Hatton, K.; DePinho, R. y Charron, M.J., "Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4", *Nature,* **377:** 151-155, 1995.

Koepsell, H. y Spangenberg, J., "Function and presumed molecular structure of Na^+ -D- Glucose Cotransport Systems", *J. Membrane Biol.,* **138:** 1-11, 1994.

Kraut, J.A.; Starr, F.; Sachs, G. y Reuben, M., "Expression of gastric and colonic $H(^+)$-$K(^+)$-ATPase in the rat kidney", *Am. J. Physiol.,* **268**(4 Pt 2)**:** 581-587, 1995.

Martin-Vasallo, P.; Dackowski, E.J.R. y Levenson, R., "Identification of a putative isoform of the Na^+, K^+-ATPase beta subunit", *J. Biol. Chem.,* **264:** 4613-4618, 1989.

Neher, E. y Sackmann B., "Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers", *Nature,* Londres, **260:** 779-802, 1976.

Noda, M.; Shimizu, S.; Tanabe, T.; Takai, T.; Kayano, T.; Ikeda, T.; Takahashi, H.; Nakayama, H.; Kanaoka, Y.; Minamino, N.; Kangawa, K.; Matsuo, H.; Raftery, M.A.; Hirose, T.; Inayama, S.; Hayasida, H.; Miyata, T. y Numa, S., "Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence", *Nature,* **312:** 121-127, Londres, 1984.

Oesterhelt, D. y Tittor, J., "Two pumps, one principle: light-driven ion transport in *halobacteria", TIBS,* **14:** 57-61, 1989.

Papazian, D.M.; Timpe, L.C.; Jan, Y.N. y Jan, L.Y., "Alteration of voltage dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence", *Nature,* **349:** 305-310, Londres, 1991.

Pedersen, P.L. y Carafoli, E., "Ion motive ATPases. I. Ubiquity, Propertieand significance to cell function", *TIBS,* **12:** 146-150, 1987.

Phylipson, K.D.; Nicoll, D.A.; Matsuoka, S.; Hryshko, L.V.; Levitsky, O.D. y Weiss, J.N., "Molecular regulation of the Na^+ - Ca^+ exchanger", *Annals New York Academy of Sciences,* **97:** 20-57, 1996.

Ponce, A.; Contreras, G. y Cereijido, M., "Polarized distribution of anion channels in epithelial cells (MDCK)", *Cell Physiol. and Biochem.,* **1:** 160-169, 1991.

Roodman, G.D., "Advances in Bone Biology: The Osteoclast", *Endocrine Reviews,* **17:** 308-332, 1996.

CAPÍTULO 7

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Martha Verónica Ponce Castañeda ■ Fernando López Casillas



Introducción

La evolución ha provisto a las células de todos los organismos vivos de mecanismos de "señalamiento" que les permiten percibir estímulos ambientales y responder adecuadamente a ellos. El éxito de estos mecanismos asegura que el organismo sobreviva a sus cambiantes circunstancias ambientales. Además, en los organismos multicelulares estos mecanismos forman redes de comunicación más complejas, que garantizan que cada célula funcione y responda a una diversidad aún mayor de estímulos y que lo haga coordinadamente con las otras células del organismo. Es gracias a esta comunicación entre células que el organismo mantiene una funcionalidad como entidad unitaria, no obstante estar constituido por millones de células de muy diverso linaje. De esta red de comunicación dependen funciones tan importantes como el desarrollo embrionario, la proliferación y diferenciación celular, las respuestas al estrés, la percepción sensorial, el movimiento, la respuesta inmune, la regulación metabólica, etcétera.

Aun en situaciones tan diversas como la degradación del glucógeno en músculo o la comunicación entre célula y célula en el cerebro, los mecanismos de señalamiento pueden resumirse en unos cuantos puntos fundamentales: una célula genera un mensaje, o *señal*, el cual es recibido por la *célula blanco* apropiada, la cual puede ser una vecina cercana o lejana, o incluso ella misma, y el mensaje es interpretado como una instrucción para modificar algún aspecto funcional de la célula blanco. El alto grado de especificidad que deben poseer los mecanismos de señalamiento queda ilustrado cuando se considera que hay algunas señales cuya instrucción es la apoptosis, también llamada "muerte celular programada", un proceso fisiológico fundamental en la embriogénesis y la respuesta inmune.

Las señales y las respuestas mediadoras de la comunicación entre células pueden ser de naturaleza *química, eléctrica* y *químico-eléctrica*. El señalamiento a través de mensajeros químicos consiste en la secreción de moléculas que deben ser reconocidas específicamente por *receptores* en las células blanco. A diferencia de las señales eléctricas y químico-eléctricas,

Las señales y las respuestas mediadoras de la comunicación entre células pueden ser de naturaleza *química, eléctrica* y *químico-eléctrica.*

las señales puramente químicas deben difundirse, o aun viajar por el torrente sanguíneo, hasta encontrar su célula blanco. Esto ocasiona que, en general, las respuestas a las señales químicas sean lentas y de mayor duración que las evocadas por señales eléctricas o químico-eléctricas. El estudio de este último tipo de señales, empleadas mayoritariamente por células excitables nerviosas y musculares, se enmarca dentro de la electrofisiología, y no se discutirán en este capítulo. Aunque nos enfocaremos en los mecanismos mediados por señales químicas, es pertinente señalar que esta división es artificial y sólo tiene fines didácticos. Un evento eléctrico, como la despolarización de una neurona, frecuentemente también genera respuestas químicas en la célula blanco, las cuales afectan a largo plazo su función. Lo que llamamos memoria es el resultado de este tipo de modificación funcional de circuitos neuronales específicos.

Las áreas de investigación comprendidas en el campo de la *transducción de señales químicas* incluyen: el estudio de la síntesis y liberación de las moléculas mensajeras (denominadas genéricamente *ligandos*); su transporte hasta las células blanco; su detección por *receptores* específicos en las células blanco; la generación por parte del complejo receptor-ligando de una segunda señal, ahora exclusivamente intracelular (la "transducción" propiamente dicha); cómo estos *segundos mensajeros* afectan *respuestas bioquímicas* inmediatas en el metabolismo celular y cómo ajustan la *expresión genética* de la célula blanco para mantener respuestas de largo plazo; y finalmente los mecanismos de disipación de la señal. Es importante hacer notar que las respuestas evocadas por una señal pueden ocasionar respuestas inmediatas y respuesta tardías que modifican la expresión génica de la célula blanco. Estos cambios en la expresión genética usualmente incluyen la producción de otras señales que a su vez modificarán la actividad de otras células. Esta concatenación de señales y respuestas constituyen el cómo las células de un organismo pluricelular mantienen una cohesión funcional armónica. La transducción de señales se ha convertido en una de las áreas de investigación más activas, debido, no sólo a su participación en prácticamente toda la fisiología del organismo, sino también al hecho de que su mal funcionamiento generalmente conduce a estados patológicos. Enfermedades tan graves como la diabetes, la hipertensión arterial y el cáncer son resultado del mal funcionamiento de los mecanismos de señalización. Es de esperarse que un entendimiento cabal de estos mecanismos, en la salud y la enfermedad, proporcionen nuevas terapéuticas, más efectivas, para estos padecimientos.

> La diabetes, la hipertensión arterial y el cáncer son resultado del mal funcionamiento de los mecanismos de señalización.



Mensajeros químicos

Inclusive los microorganismos unicelulares secretan moléculas mensajeras que coordinan muchas funciones; por ejemplo, la agregación de células para intercambio sexual, o la diferenciación que ocurre en ciertas circunstancias ambientales. Cuando estas moléculas alteran la expresión genética o la conducta de otros organismos de la misma especie, reciben el nombre de feromonas. En animales y plantas los mensajeros químicos funcionan tam-

bién en el *interior* del organismo en donde tienen papeles centrales en el control de la fisiología del organismo.

Los mensajeros químicos son moléculas con características químicas muy diversas: hay péptidos, proteínas, complejos proteicos, moléculas pequeñas derivadas de aminoácidos, compuestos lipídicos derivados del ácido araquidónico y compuestos esteroideos derivados del colesterol. Según sus propiedades de solubilidad y la localización de sus receptores, las moléculas mensajeras se clasifican en:

> Los mensajeros químicos son moléculas con características químicas muy diversas.

a) Moléculas *lipofílicas*; son aquellas capaces de difundirse a través de la membrana plasmática e interaccionar con receptores del citosol o del núcleo; por ejemplo, las hormonas esteroideas, la tiroxina y los derivados del ácido retinoico. Después de atravesar la membrana plasmática, estas hormonas interactúan con receptores intracelulares, formando complejos capaces de incrementar o disminuir la transcripción de genes específicos; estos complejos también contribuyen a la estabilidad de ciertos RNA mensajeros. Generalizando, estos compuestos ejercen su efecto por horas o días y contribuyen al crecimiento y diferenciación de tejidos específicos.

> Las moléculas *lipofílicas* son aquellas capaces de difundirse a través de la membrana plasmática e interaccionar con receptores del citosol o del núcleo.

b) Moléculas *hidrofílicas*; son aquellas que no pueden difundirse a través de la membrana plasmática e interaccionan con receptores localizados en la superficie celular; por ejemplo, péptidos como la insulina, o proteínas como la hormona del crecimiento y pequeñas moléculas cargadas como la acetilcolina y otras derivadas de algunos aminoácidos como la epinefrina, la histamina, la serotonina y la dopamina, algunas de las cuales funcionan como hormonas o como neurotransmisores. Muchas de estas moléculas modifican la actividad de una o más enzimas ya presentes en la célula. En estos casos, el efecto de la molécula ligada a la superficie celular es casi inmediato, pero persiste sólo por un periodo pequeño; sin embargo, el efecto de algunos factores tróficos se puede extender por varios días, pues también pueden regular los patrones de expresión genética de la célula blanco.

> Las moléculas *hidrofílicas* son aquellas que no pueden difundirse a través de la membrana plasmática e interaccionan con receptores localizados en la superficie celular.

c) Moléculas *lipofílicas* con *receptores* de superficie; los ejemplos principales de este grupo son las prostaglandinas, moléculas derivadas del ácido araquidónico, de las cuales hay por lo menos 16 tipos distintos. Varias prostaglandinas actúan como mediadores locales. Ciertos miembros de este grupo provocan la agregación plaquetaria y desempeñan un papel importante en el fenómeno de la coagulación, por lo que intervienen en el curso de enfermedades vasculares y reparación de heridas.

Según la distancia que hay entre la célula productora y la célula blanco sobre la que actúan, las moléculas señaladoras también se clasifican en:

Moléculas de señalización *endocrina*; son aquellas que actúan sobre células blanco distantes del sitio u órgano de síntesis (figura 7-1). A este grupo pertenecen las hormonas como la de crecimiento, la insulina, la progesterona, la tiroxina, etc. En los animales, las hormonas son llevadas a través del torrente sanguíneo de su sitio de síntesis hasta las células blanco y la distancia en la que esta comunicación ocurre varía desde unos cuantos micrómetros hasta varios metros. Las moléculas de secreción o señaliza-

> Las moléculas de señalización *endocrina* son aquellas que actúan sobre células blanco distantes del sitio u órgano de síntesis.

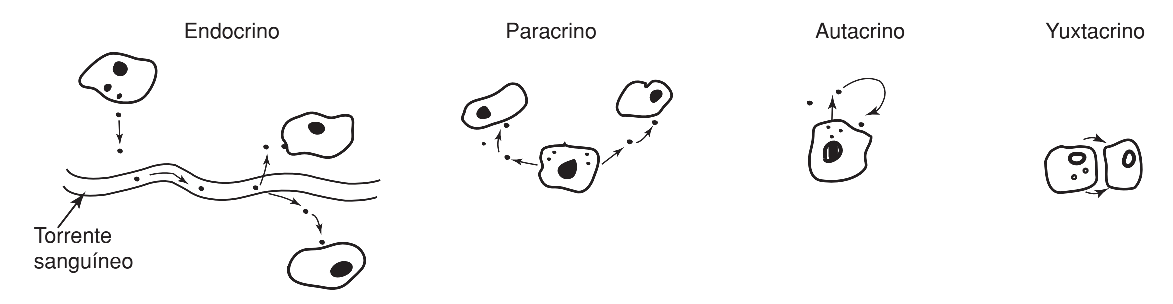


Figura 7-1. Formas de señalamiento mediadas por mensajeros químicos.

Las moléculas de secreción o señalización *paracrina* son aquellas moléculas liberadas por una célula y que afectan sólo a las células que se encuentran en la proximidad inmediata.

La señalización de autocomunicación celular o *autocrina*, es la situación en que las células responden a moléculas que ellas mismas producen.

Las moléculas de secreción *yuxtacrina* son proteínas ancladas en la superficie de la membrana plasmática de una célula que pueden interaccionar directamente con los receptores en la superficie de la célula adyacente.

ción *paracrina* son aquellas moléculas liberadas por una célula y que afectan sólo a las células que se encuentran en la proximidad inmediata. La neurotransmisión sináptica, esto es, la transmisión de un impulso eléctrico de una célula nerviosa a otra o de una célula nerviosa a una célula muscular por medio de efectores químicos entre sinapsis, son ejemplos de señalización paracrina mediada por neurotransmisores y neurohormonas. Igualmente, es paracrina la comunicación por factores de crecimiento celular, producidos por células en órganos o tejidos como el hígado o la piel, y que actúan sobre otras estirpes celulares vecinas. La distancia en la que ocurre esta comunicación se encuentra en el rango de los micrómetros. La de las moléculas de secreción involucradas en señalización de autocomunicación celular o *autocrina,* es la situación en que las células responden a moléculas que ellas mismas producen. Varios factores tróficos actúan de esta manera y muchos cultivos celulares secretan los factores que estimulan su propio crecimiento y proliferación. Hay tumores que producen grandes cantidades de factores de crecimiento, lo que conduce a la aparición de las masas tumorales. De manera similar a la señalización paracrina, la distancia en la que ocurre esta comunicación se encuentra en el rango de los micrómetros. Las moléculas de secreción *yuxtacrina* son proteínas ancladas en la superficie de la membrana plasmática de una célula que pueden interaccionar directamente con los receptores en la superficie de la célula adyacente. Los efectos proliferativos del precursor membranal del TGF-α (*transforming growth factor*-α) son un ejemplo de comunicación yuxtacrina.

Algunos compuestos pueden funcionar en varias de estas modalidades de comunicación, como es el caso de la epinefrina que actúa como un neurotransmisor (señalización paracrina), tanto como hormona sistémica (señalización endocrina), o el TGF-α, que también puede liberarse de su precursor membranal y actuar paracrinamente. La diferencia crucial en estos tipos de señalamiento está en la velocidad y selectividad con que los mensajeros encuentran a sus células blanco.

Receptores

Desde hace casi un siglo, los científicos postularon que la detección de las señales extracelulares debería involucrar *receptores,* estructuras que reco-

nocen al mensajero extracelular y que *transducen* el mensaje al ambiente intracelular. La detección y la cuantificación de estos receptores ha sido posible desde la década de 1960 con el desarrollo de técnicas de detección muy sensibles que emplean ligandos radiactivos y la implementación de otras técnicas poderosas como la cromatografía de afinidad y las técnicas de biología molecular.

Hoy en día sabemos que la respuesta celular a una molécula mensajera, designada en forma general como *ligando* (hormona, citosina, factor trófico o neurotransmisor), depende de su enlace o interacción con un *receptor específico* para ese ligando. Generalmente, el receptor es una *proteína* que puede estar localizada en la superficie de la célula blanco, el citosol o su núcleo. Las interacciones o uniones ligando-receptor son de alta afinidad, no covalentes, y ocasionan un cambio conformacional en el receptor, el cual inicia una serie de reacciones que conducen a un cambio en la función celular.

Una molécula mensajera, designada en forma general como "*ligando*" (hormona, citocina, factor trófico o neurotransmisor), depende de su enlace o interacción con un *receptor específico* para ese ligando.

La mayoría de los receptores identificados han sido descritos en base a su capacidad para unirse a ligandos radiactivos particulares (figura 7-2), estudios que han permitido caracterizar su especificidad y su cinética de enlace. En algunos casos usando reactivos entrecruzadores que permiten enlazar covalentemente receptores con sus ligandos, ha sido posible establecer el peso molecular aproximado del receptor, al visualizar estos complejos a través de electroforesis en gel y sustrayendo el peso del ligando. Sin embargo, la poca abundancia de estos receptores integrales de membrana dificultaba su caracterización bioquímica detallada. Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular ha sido posible clonar y determinar la estructura primaria de muchos receptores.

El ligando no se metaboliza en productos útiles, no es un intermediario en ninguna actividad celular y no tiene propiedades enzimáticas. La única función del ligando parece ser la de cambiar ciertas propiedades del receptor que indican en el interior de la célula la presencia de un ligando específico en el ambiente extracelular. En algunas células blanco, la degradación o modificación del ligando puede modificar o terminar la repuesta al men-

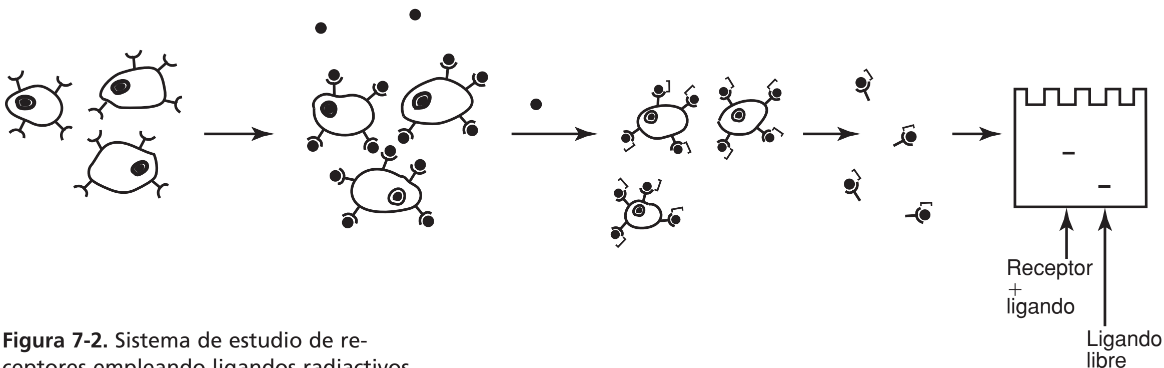


Figura 7-2. Sistema de estudio de receptores empleando ligandos radiactivos y entrecruzadores (⌐), y detección por electroforesis en geles de acrilamida y autorradiografía.

sajero. Uno de los efectos más comunes de la unión de ligandos a muchos tipos de receptores de superficie es el aumento o disminución generalmente de poca duración en la concentración de *segundos mensajeros*. Entre los segundos mensajeros más importantes están: 3',5'-AMP cíclico, 3',5'-GMP cíclico, 1,2-diacilglicerol, inositol 1,4,5-trifosfato y Ca^{+2}.

La respuesta de una célula o tejido a mensajeros específicos está determinada por los receptores que posee y por el estado metabólico o de diferenciación celular, el cual pudo haber sido modificado previamente por otros ligandos, de ahí que el mismo receptor pueda estar presente en distintas estirpes celulares, y el enlace de su ligando puede desencadenar distintas respuestas en cada estirpe celular. En vista de que su localización celular y mecanismos transductores son diferentes, se discutirán primeramente los receptores de membrana celular y sus mecanismos propagadores de la señal y al final del capítulo se presentarán los receptores nucleares.



Receptores localizados en la membrana plasmática

En base a la similaridad de sus secuencias, a la predicción de su estructura secundaria y terciaria, así como a sus actividades bioquímicas, es posible definir por lo menos cuatro grandes grupos o clases de receptores localizados en la superficie celular:

Receptores con actividad enzimática.
Receptores acoplados a proteínas G.
Receptores sin actividad enzimática, pero asociados a proteínas citosólicas.
Receptores accesorios o correceptores.

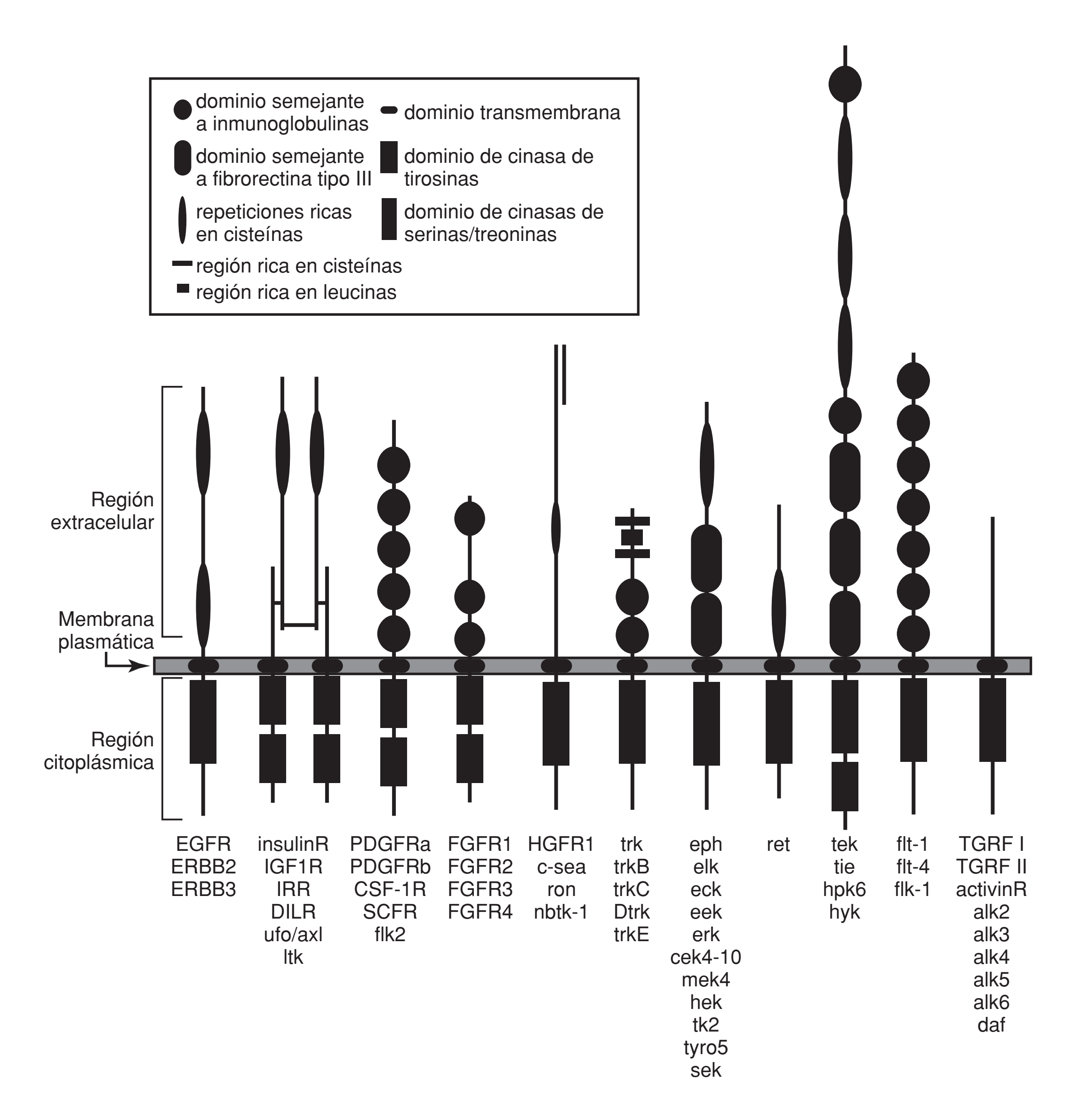
Grupo de receptores con actividad enzimática

Los motivos estructurales que unifican al grupo de receptores con actividad enzimática son las regiones o dominios citoplásmicos, los cuales son de naturaleza catalítica. Las diversas reacciones enzimáticas de las regiones citoplásmicas de este grupo de receptores incluyen: actividad de cinasas de proteínas, fosfatasas de proteínas y guanilato-ciclasas. Los mecanismos de activación de los receptores cinasa son los mejor caracterizados, por lo que a continuación se discutirán brevemente.

Los receptores cinasa y en general las cinasas son enzimas que transfieren grupos fosfato a sus sustratos.

Los receptores cinasa y en general las cinasas son enzimas que transfieren grupos fosfato a sus sustratos. La importancia fisiológica de este grupo de receptores es amplísima, pues son los responsables de mediar las respuestas a hormonas como la insulina y otros factores de crecimiento celular como el EGF (*epidermal growth factor*) y el TGF-β (*transforming growth factor*-beta). Las cinasas de proteínas se clasifican de acuerdo a su especificidad por el sustrato: una clase fosforila residuos de tirosina y otra clase fosforila residuos de serina y treonina.

Los receptores con actividad de cinasa de tirosina tienen una topología que determina que el dominio de unión al ligando esté separado del dominio cinasa por la membrana plasmática (figura 7-3). En ausencia del ligan-

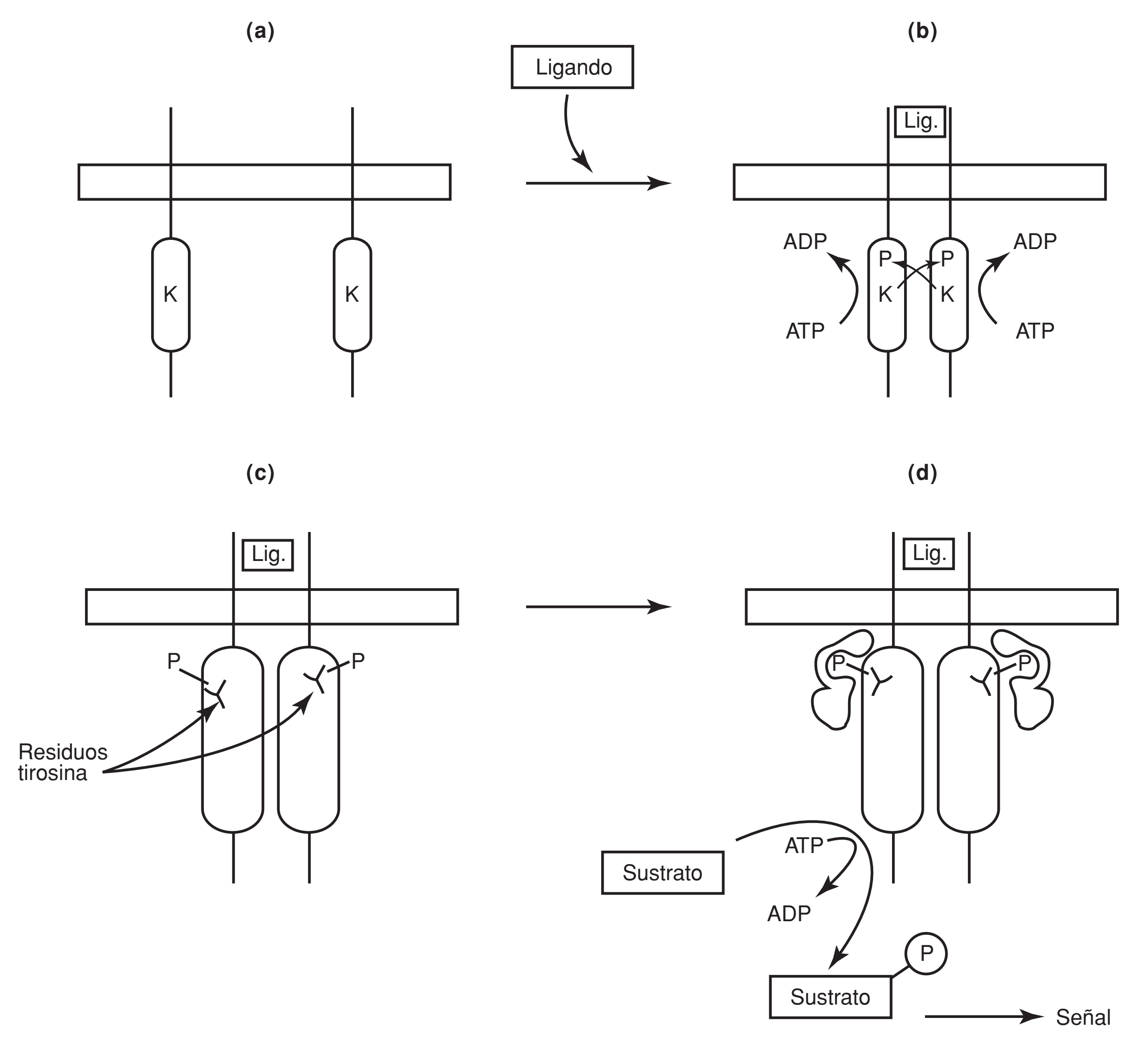


Abreviaciones:

EGF = factor de crecimiento epidermal
IGF = factor de crecimiento semejante a insulina
IRR = receptor relacionado a insulina
PDGF = factor de crecimiento derivado de plaquetas
CSF-1 = factor estimulante de colonias
SCF = factor de células progenitoras
FGF = factor de crecimiento de fibroblastos
HGF = factor de crecimiento de hepatocitos
TGF-β = factor transformante de crecimiento β

Figura 7-3. Representación esquemática del grupo de receptores con actividad enzimática de cinasas.

do estos receptores están en estado monomérico y al unirse a su ligando se induce (o estabiliza) su homodimerización. Esta dimerización permite la transmisión de un cambio conformacional del dominio extracelular al dominio citoplásmico que activa el dominio catalítico y produce la autotransfosforilación de los receptores. Esto quiere decir que la cinasa de un receptor fosforila residuos del otro receptor, aunque hay excepciones y variaciones a este modelo (figura 7- 4). Este episodio de autofosforilación es el detonante de una reacción en cadena que no sólo transduce y amplifica la señal, sino que también la dirige a múltiples blancos intercelulares. A partir del receptor autofosforilado, las respuestas celulares pueden ser in-



La dimerización inducida por un ligando, provoca transfosforilación de los receptores **a)** y **b),** esta fosforilación **c)** induce la actividad cinasa de estos receptores sobre *otros* sustratos, transmitiendo así la señal a otro componente de la vía de señalización. Los residuos fosforilados también sirven como sitio de anclaje a otras proteínas transductoras.

Figura 7-4. Activación de los receptores con actividad de cinasa de proteínas en residuos tirosina.

mediatas, como el incremento en la entrada de glucosa, o de largo plazo, como la activación transcripcional de ciertos genes, o el arranque de la división celular, todos ellos efectos del receptor de insulina.

La principal función de los sitios autofosforilados por estos receptores es la de servir como punto de anclaje de proteínas efectoras como la fosfolipasa Cγ o la cinasa del fosfatidilnositol-4,5, bisfosfato, las cuales a su vez pueden ser fosforiladas por la cinasa del receptor y así propagar intracelularmente la señal del ligando. Otras proteínas que se anclan a los residuos fosfotirosina de los receptores son las llamadas "proteínas acopladoras", las cuales, gracias a su diseño modular (ver más adelante), contribuyen a formar complejos multiproteicos que, generalmente a través de varios relevos de fosforilación, pueden hacer llegar el mensaje hasta el núcleo celular. Otra función transductora de estas cinasas fosforiladas es la de fosforilar otros sustratos que inician otras vías de señalamiento, como es el caso del IRS-1 sustrato de la cinasa del receptor de insulina.

Los receptores con cinasas de serina/treonina tienen un diseño similar a los receptores con cinasas de tirosinas en cuanto a que tienen una región extracelular de unión al ligando y una región citoplasmática con actividad de cinasa de proteínas. No obstante, sus diferencias son más notables, pues no sólo fosforilan distintos residuos, sino que sus sustratos citoplásmicos son rápidamente dirigidos al núcleo en donde funcionan principalmente como reguladores transcripcionales. Por ejemplo, para el TGFβ existen dos receptores, el tipo I y el tipo II, ambos con actividad de cinasa que se asocian en un heterodímero en presencia del ligando, causando la fosforilación del receptor I por el II (figura 7-5). El receptor I fosforilado a su vez fosfo-

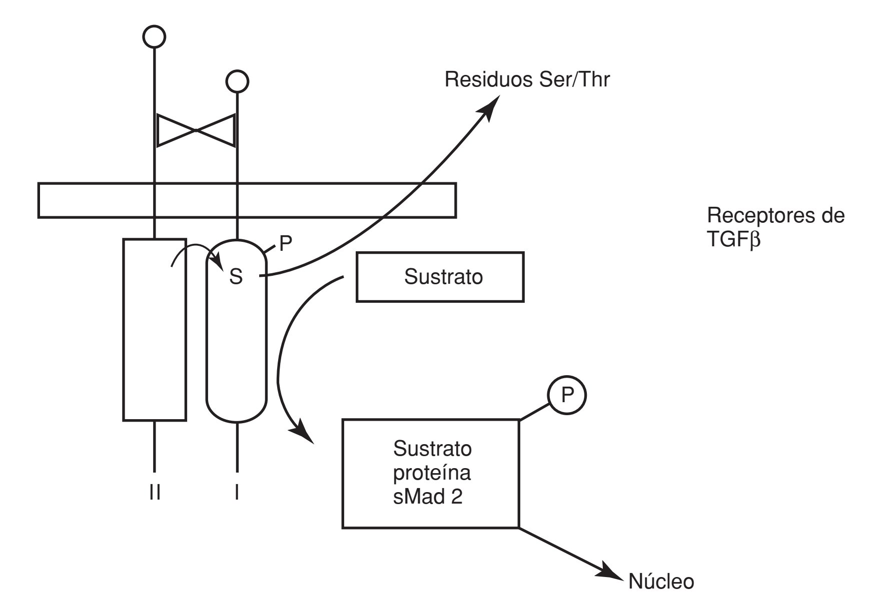


Figura 7-5. Representación del mecanismo de acción de los receptores del TGFβ. La unión del TGFβ (α) a los receptores I y II produce la fosforilación del receptor I por el II en residuos Ser/Thr, esta fosforilación induce la actividad cinasa del receptor I y actúa fosforilando su sustrato la proteína sMad 2. En estado fosforilado sMad 2 se transloca directamente al núcleo, donde induce la expresión de ciertos genes.

rila a miembros de la familia de proteínas llamadas *sMads*, las cuales migran al núcleo a regular los genes blancos del TGFβ.

Grupo de receptores acoplados a proteínas G

Las proteínas G son proteínas integrales de membrana que consisten en una cadena polipeptídica de aproximadamente 450 residuos.

Este grupo de receptores comprende más de 300 miembros conocidos a nivel de secuencia primaria. Son proteínas integrales de membrana que consisten en una cadena polipeptídica de aproximadamente 450 residuos, cuya estructura posee siete hélices α transmembranales unidas por asas alternadas intracelulares y extracelulares. El extremo amino-terminal se encuentra en el lado extracelular de la membrana y el carboxilo-terminal al interior citosólico, y este último contiene secuencias que corresponden a sitios consenso de fosforilación por proteínas cinasas. Estos receptores se encuentran acoplados a proteínas G discutidas más adelante (figura 7-6).

El rango de estímulos extracelulares o ligandos que utilizan estos receptores es muy amplio e incluye moléculas odorantes, neurotransmisores y una gran variedad de péptidos, hormonas proteicas, inclusive la luz funciona como ligando de la rodopsina en la retina, caso discutido en detalle más adelante. La estructura del dominio de enlace depende mucho de la naturaleza del ligando; mientras que las regiones transmembrana de los receptores adrenérgicos son importantes para la unión del ligando, en el caso de hormonas polipeptídicas, como la hormona luteinizante, la unión ocurre principalmente en los dominios extracelulares. También existen receptores de este grupo asociados a canales iónicos. La unión de los ligandos promueve la interacción entre el receptor y una proteína G heterotrimérica, ubicada en el lado intracelular de la membrana, la que regula uno o varios mediadores intracelulares. La mayoría de estos receptores utiliza cascadas complejas y relevos de mediadores intracelulares. Estas cascadas catalíticas de segundos mensajeros proveen varias oportunidades para amplificar la respuesta a las señales extracelulares.

Los receptores de esta familia están sujetos a eventos de desensibilización altamente conservados que ocurren en el interior celular y que involucran fosforilación y el enlace de proteínas inhibitorias que previenen la reasociación de las proteínas G.

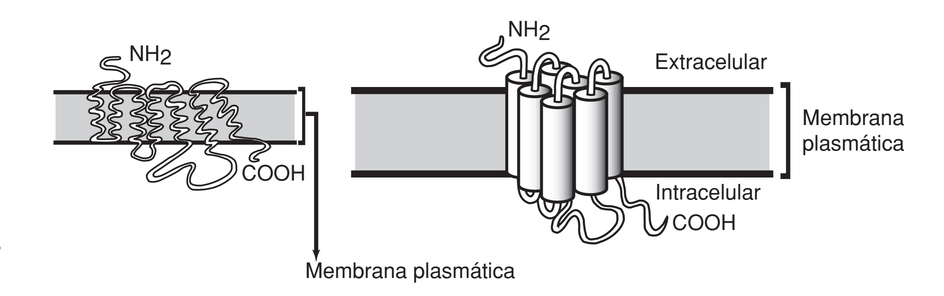


Figura 7-6. Representaciones esquemáticas de la organización estructural de la familia de receptores con siete dominios transmembranales.

En general, las respuestas finales de una célula a estímulos que llegan a través de vías de señalamiento por proteínas G, son fisiológicas más que de desarrollo, de corto más que de largo plazo, y dirigidas a la actividad de proteínas preexistentes más que a la expresión de nuevos genes, aunque pueden ocurrir también efectos sobre la transcripción, traducción y expresión genética.

Rodopsina

La rodopsina es el receptor encargado de la fototransducción en la retina de vertebrados.

La rodopsina, el primer receptor perteneciente a la familia de siete hélices transmembranales secuenciado, es el receptor encargado de la fototransducción en la retina de vertebrados y es el miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G del que se tiene el conocimiento más detallado. A pesar de las diferencias en detalles moleculares respecto a otros receptores, este sistema de señalamiento mediado por proteínas G comparte ciertas características y funciona con principios generales semejantes a los de otros miembros de esta familia, por lo que a continuación se mencionarán sus características.

La rodopsina se encuentra en los bastones, células de la retina sensibles a la luz y que son responsables de la visión monocromática en presencia de poca luz. De modo aparentemente paradójico, este receptor convierte la energía luminosa en un fenómeno de hiperpolarización (en lugar de una despolarización) en la membrana del bastón mediada por una caída en la concentración del nucleótido GMP-cíclico. Debido a que en la oscuridad los neurotransmisores actúan inhibiendo muchas de las neuronas postsinápticas de la retina, la luz, a través de la hiperpolarización, libera a las neuronas de la inhibición excitándolas.

La membrana plasmática de los bastones contiene canales de Na^+ regulados por GMP-cíclico. Estos canales se mantienen abiertos en la oscuridad a través del enlace de GMP-cíclico a los canales, cuando la luz provoca una caída en la concentración de GMP-cíclico, el GMP se separa de estos canales y se cierran provocando un estado hiperpolarizado de las membranas, lo que inhibe el señalamiento sináptico.

Para comprender este proceso, hay que mencionar que cada molécula de rodopsina contiene un cromóforo unido covalentemente, llamado 11-*cis* retinal; cuando la luz es absorbida, la forma del retinal cambia casi instantáneamente a su isómero *trans*-retinal, provocando a su vez un cambio conformacional en la rodopsina activándola. La rodopsina activada se enlaza a la proteína G trimérica llamada transducina, provocando que la subunidad α se disocie y active la GMP-cíclico-fosfodiesterasa, la que hidroliza al GMP-cíclico haciendo caer su concentración citosólica. Con esta caída, el GMP se disocia de los canales de Na^+ de la membrana cerrándolos, llevando así a la membrana plasmática a un estado hiperpolarizado; de este modo, la señal luminosa es convertida en una señal eléctrica, el impulso nervioso.

Una característica clave del sistema visual es la enorme amplificación alcanzada: una rodopsina puede catalizar la activación de cientos de moléculas

de transducina y cada transducina activa una fosfodiesterasa, la cual hidroliza aproximadamente 4,000 moléculas de GMP-cíclico por segundo. Esta cascada catalítica de amplificación dura menos de un segundo y resulta en la hidrólisis de más de 10^5 moléculas de GMP-cíclico lo que provee a los bastones con sensibilidad para responder a un solo fotón de luz (figura 7-7).

La fototransducción es un sistema de transducción de señal atípico, ya que requiere sensibilidad extrema, un número de ligandos bajo (un fotón único) y un trasfondo bajo. Debido a la enorme cantidad de energía del fotón (50 kcal/mol para luz verde), éste puede impulsar un estado de equilibrio de receptores totalmente inactivos (0.000000000000001% moléculas activas) a receptores totalmente activos (99.9% moléculas activas). La rodopsina es así una proteína que provee un rango dinámico amplio, de totalmente apagado a totalmente encendido. Si sólo dependiese de la activación térmica, este sistema solamente se activaría espontáneamente una vez cada 2000 años y la naturaleza irreversible de la hidrólisis del GTP implica que, cuando la hidrólisis es completa, el sistema está completamente apagado. Como ya se mencionó, las propiedades tan particulares del sistema de fototransducción son propiedades de su ligando altamente energético, en contraste con otros receptores acoplados a proteínas G en los que la energía para activar el receptor es provista por el enlace de moléculas fre-

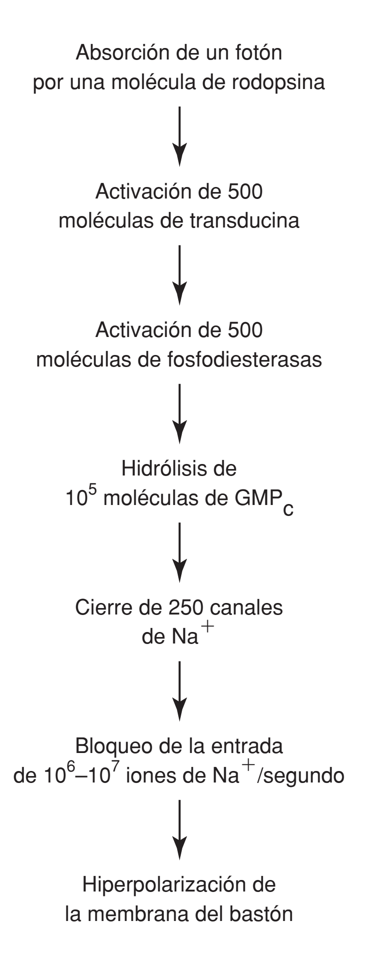


Figura 7-7. Esquema en el que se aprecia la amplificación alcanzada en el sistema de fototransducción mediado por una sola molécula de rodopsina.

cuentemente pequeñas, incluyendo péptidos como oxitocina y vasopresina, polipéptidos más grandes como la gonadotropina coriónica, moléculas muy pequeñas como la adrenalina, ATP o serotonina, y moléculas orgánicas pequeñas involucradas en el olfato y el gusto. Debido a que el enlace de estas moléculas es relativamente fuerte (en el rango nanomolar), no puede haber mucha energía libre para cambiar el equilibrio del receptor en más de unas cuantas kilocalorías, por lo que los receptores no unidos a ligando generalmente tienen una actividad espontánea apreciable, esto es, no se encuentran totalmente apagados; la rodopsina es una excepción, teniendo esencialmente cero de actividad espontánea.

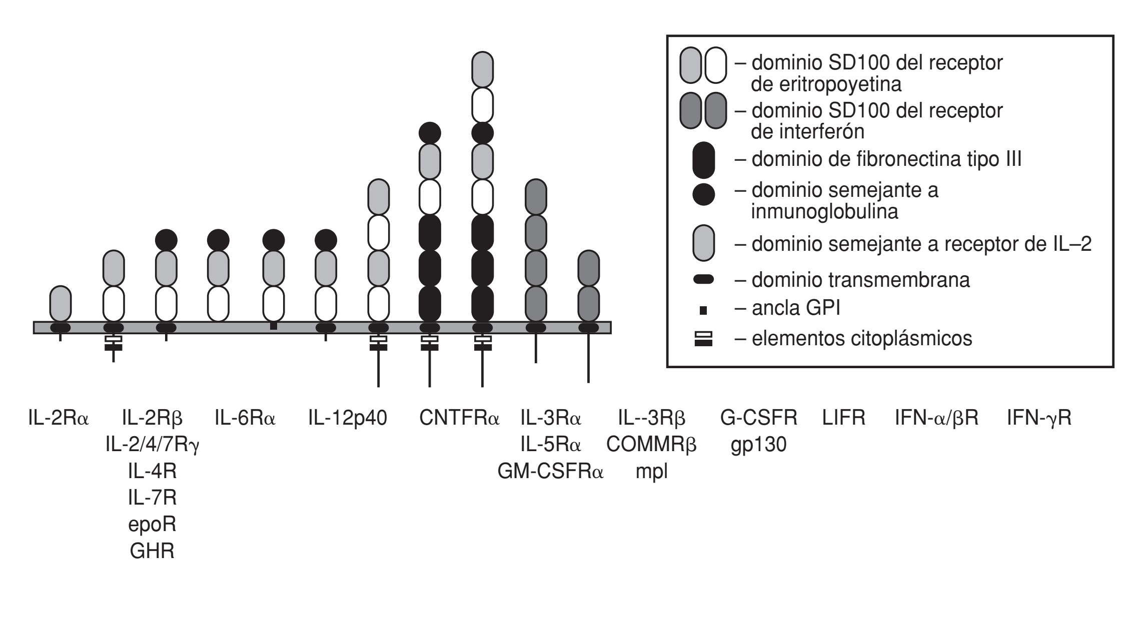
Ya que se puede esperar que los distintos ligandos provean distintas energías a sus receptores (variando de 2 kcal/mol para moléculas pequeñas que se enlazan fuertemente hasta 50 kcal para la luz), una de las principales funciones de estos receptores es la de igualar energéticamente la interacción del ligando-receptor a la activación de las moléculas blanco intermedias.

Receptores sin actividad enzimática, pero asociados a proteínas citosólicas

Estos receptores son glicoproteínas transmembranales con regiones extracelulares que unen al ligando y regiones citoplásmicas carentes de actividad catalítica. Como se discutirá más adelante (ver vía de JAK/STAT), la función de las regiones intracelulares de estos receptores es la de servir de sitios de anclaje para otras proteínas citosólicas transductoras de la señal. Los receptores de las *citocinas* pertenecen a esta categoría. Las citocinas son importantes factores polipeptídicos producidos por células linfoides, monocíticas y hematopoyéticas y que son reguladores centrales de la respuesta inmune y la inflamación. Las citocinas conforman un grupo heterogéneo que incluye a las interleucinas (IL), los interferones (IFN), los factores de necrosis tumoral (TNF), la eritropoyetina, la hormona de crecimiento y la prolactina, entre otros.

Las citocinas son importantes factores polipeptídicos producidos por células linfoides, monocíticas y hematopoyéticas y que son reguladores centrales de la respuesta inmune y la inflamación.

En base a la similitud estructural de las regiones extracelulares, estos receptores se pueden agrupar en dos grandes subgrupos: el subgrupo IL/IFN/eritropoyetina/hormona del crecimiento y el subgrupo del TNF. Los miembros del primer subgrupo contienen dominios extracelulares similares a fibronectina III y/o dominios similares a inmunoglobulinas. La característica unificadora de esta familia es la presencia de uno o dos dominios de 200 aminoácidos, llamado SD200, formado a su vez por dos subdominios de 100 aminoácidos (figura 7-8). El complejo de la hormona de crecimiento acoplada a su receptor es un ejemplo representativo de esta clase de receptores y su estructura ha sido resuelta cristalográficamente. Este receptor contiene 7 tiras-β que forman una estructura como barril, similar a la molécula de superficie CD4 y a la fibronectina tipo III. La estequiometría de este complejo es 2:1, en la cual el receptor interactúa con el ligando usando residuos similares. Las estructuras que definen a los miembros del subgrupo del TNF están localizadas también en el dominio extracelular y



abreviaciones: IL = interleucina
epo = eritropoyetina
GH = hormona de crecimiento (del inglés Growth Hormone)
PL = prolactina
CNTF = factor neurotrófico ciliar
G-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos
COMM = cadena común del receptor para IL-3 e IL-5
LIF = factor de inhibición leucémico
IFN = interferón
R = receptor

Figura 7-8. Representación esquemática del grupo de receptores semejantes a eritropoyetina/interferón.

consisten en cuatro copias de un dominio que contiene 6 residuos de cisteína; además, comparten cierta similaridad en sus secuencias citoplásmicas (figura 7-9). En solución, tres moléculas del receptor interactúan con un trímero del ligando y esta estequiometría ha sido confirmada recientemente con la resolución de la estructura cristalográfica del complejo TNF-β y su receptor. Este complejo exhibe simetría perfecta, en la que cada receptor interacciona con la interfase de dos de las tres moléculas de TNF de modo idéntico.

Receptores accesorios o correceptores

Las moléculas localizadas en la superficie celular capaces de unir ligandos con alta afinidad y especificidad, pero incapaces de transducir por sí mismos la señal al interior celular se denominan receptores accesorios. No obstante, un nombre más adecuado para este tipo de moléculas es el de “correceptores”, pues su presencia regula la unión de los ligandos a sus auténticos re-

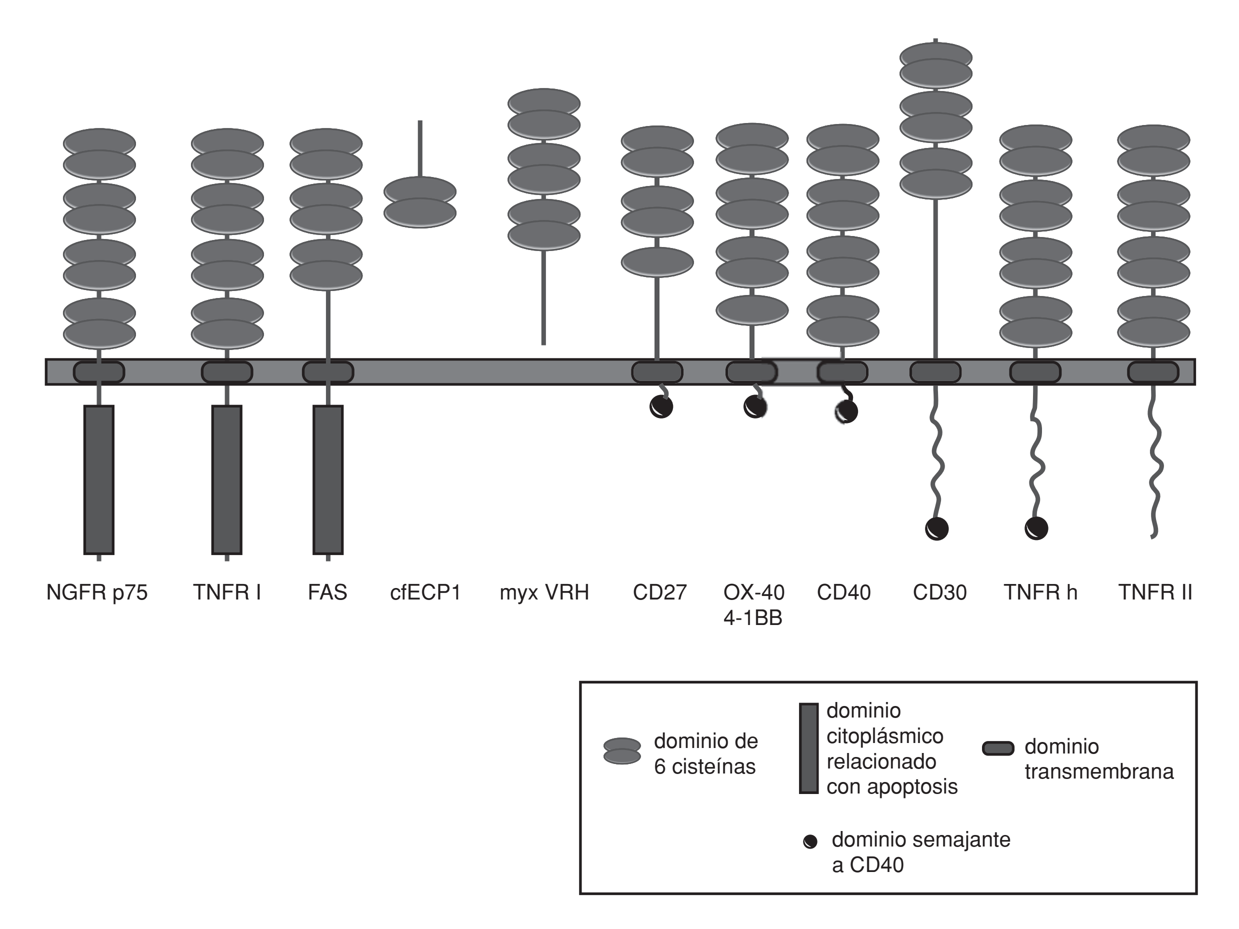


Figura 7-9. Representación esquemática del grupo de receptores semejantes a TNF/NGF.

ceptores de señalamiento y con ello determina la actividad del ligando en cuestión. Unos de los correceptores mejor estudiados son los proteoglicanos de sulfato de heparán. Este tipo de glicoproteínas están compuestas por una proteína medular, a la cual se unen covalentemente carbohidratos complejos, llamados glicosaminoglicanos. Los sulfatos de heparán son una variedad de glicosaminoglicanos que unen FGF (factor de crecimiento fibroblástico) y lo presentan a sus receptores de señalamiento, los cuales son proteínas transmembranales con actividad de cinasas de tirosina. Es interesante hacer notar que, a diferencia de otros receptores y correceptores, la parte funcional de este correceptor son los carbohidratos (los sulfatos de heparán) y no el polipéptido. Para evocar sus efectos a concentraciones "fisiológicas", el FGF requiere de la presencia de los heparán-sulfatos, los cuales favorecen la formación del complejo ligando-receptor. Los correceptores no sólo aumentan la concentración neta de ligando alrededor del receptor de

señal, sino que también propician cambios conformacionales en el ligando y/o el receptor que favorecen su interacción.



Mecanismos transductores

Proteínas G

Las proteínas G pertenecen a la superfamilia de proteínas con actividad de GTPasa.

Las proteínas G pertenecen a la superfamilia de proteínas con actividad de GTPasa; esta familia incluye dos grandes grupos de proteínas que participan en distintas vías de transducción:

I) Las proteínas G de bajo peso molecular monoméricas tales como *Ras*, que participa en las vías de transducción que conducen a la proliferación celular, *Rho* que regula la arquitectura celular, modificando elementos del citoesqueleto de actina ante diversos estímulos extracelulares, y *Rab* que participa en la movilización intracelular de vesículas.

II) Las proteínas G heterotriméricas, cuyos componentes son una subunidad α, responsable de la unión e hidrólisis del GTP y las subunidades β y γ que funcionalmente actúan siempre juntas.

Las proteínas G heterotriméricas están asociadas a la cara interna de la membrana plasmática, funcionan como componentes acoplables pasando información de los receptores a las enzimas o sistemas efectores encargados de producir segundos mensajeros (tema discutido más adelante). La proteína G heterotrimérica consiste en tres subunidades α, β y γ. La subunidad α es la más grande y está involucrada en el enlace al nucleótido de guanina (GDP o GTP); cuando tiene GDP unido es inactiva y se encuentra formando parte del trímero. En una reacción catalizada por el receptor (en la que el ligando o agonista se enlaza al dominio extracelular del receptor), el GDP es intercambiado por GTP. Este enlace ocasiona que la subunidad Gα se disocie del dímero $\beta\gamma$ y al difundir lleva el mensaje hacia alguna proteína blanco "corriente abajo" en los eventos de transducción. La subunidad Gα es generalmente, pero no siempre, la señal activa e interactúa con varias proteínas blanco intermedias. Por ejemplo, algunas subunidades Gα activan a la adenilato-ciclasa localizada en la membrana, la cual produce AMPc; éste a su vez activa diversas cinasas dependientes de AMPc, las que también fosforilan muchas proteínas blanco involucradas en respuestas celulares, activando o inhibiéndolas (figura 7-10).

Cada tipo de proteína G al ser activada por sus receptores conecta a una o varias moléculas blanco, incluyendo:

- Algunos tipos de canales iónicos de calcio y potasio.
- La adenilato-ciclasa.
- La guanilato-ciclasa.
- La fosfolipasa C-β (la enzima que libera inositol a partir de los lípidos de la membrana).
- La fosfolipasa A2 (la enzima que libera ácido araquidónico, un precursor de prostaglandinas y leucotrienos a partir de lípidos de la membrana).

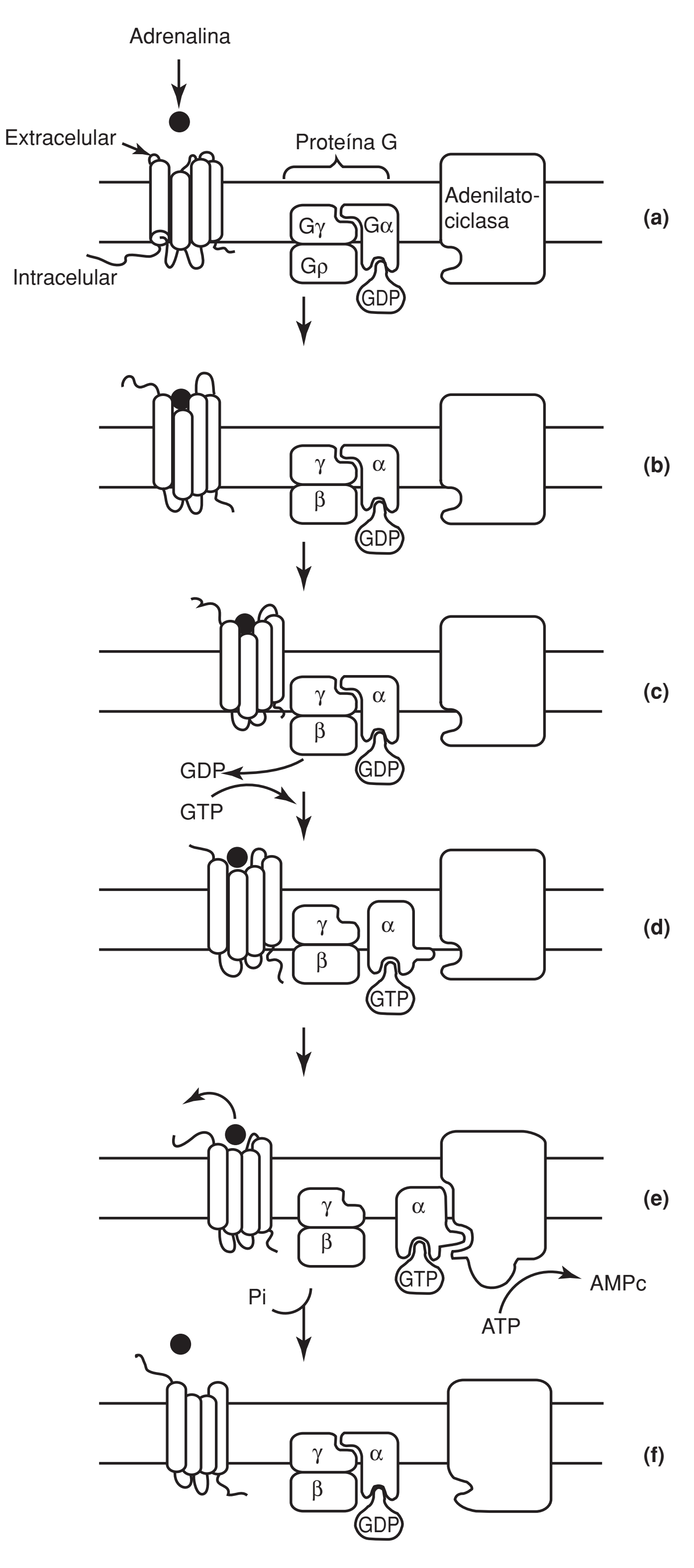


Figura 7-10. Representación de la activación de la adenilato-ciclasa por epinefrina a través de su receptor y proteínas G triméricas.

Cuando la epinefrina se une a su receptor, **a) b)** la subunidad α de la proteína G intercambia GDP por GTP **c) d),** esto provoca su activación y disociación trimérica. Su asociación con la adenilato-ciclasa activa a esta enzima **e).** Cuando la subunidad α hidroliza el GTP a GDP se inactiva y reconstituye el trímero αβγ **f).**

- La fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos.
- Activación de cinasas como *Raf*.

La señal de la proteína G es autolimitada, ya que la subunidad Gα contiene además una actividad intrínseca de GTPasa que hidroliza GTP a GDP a una velocidad lenta (segundos o minutos). Una vez que el GTP se ha hidrolizado, la subunidad Gα se recombina con el dímero βγ para reconstituir la proteína trimérica inactiva. Esta actividad de GTPasa asegura que la proteína G permanezca en estado activo sólo un periodo corto, de modo que la proteína G tiene una función doble, es un intermediario o relevo de la señal del receptor al efector y es un reloj que controla la duración de la señal.

La caracterización y los estudios sobre los complejos triméricos indican que hay cuando menos veinte miembros de la subunidad α, cinco de la subunidad β y doce de la subunidad γ. Las distintas subunidades α, cuyo peso molecular oscila entre 39 y 52 kDa comparten una homología estructural entre 45 y 80% y han sido divididas en $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12}$, según si cada uno de los miembros de estas subfamilias interacciona con diferentes moléculas efectoras estimulando o inhibiendo su actividad.

Esta variabilidad puede potencialmente generar cientos de combinaciones; sin embargo, en los organismos se dan sólo unas cuantas combinaciones específicas. Las respuestas celulares complejas como la proliferación o diferenciación son generalmente estimuladas por combinaciones específicas de señales más que por una señal única; como la célula tiene que integrar la información que recibe para emitir una respuesta apropiada (la integración parece depender de las interacciones entre varias cascadas de fosforilación que se activan por señales extracelulares distintas), la diversificación de combinaciones de proteínas G provee a la célula con cierta capacidad de cálculo sobre las vías de señalamiento iniciales, en la medida en que los estímulos recibidos a través de distintos receptores pueden sumarse o cancelarse unos a otros.

Generalizando, se puede decir que las proteínas G son moléculas que funcionan como *interruptores acoplables* (esto es, pueden apagar o encender una señal), mecanismo empleado en todo el reino animal, vegetal e incluso por organismos unicelulares como las levaduras. Estas moléculas están involucradas en muchas funciones no relacionadas necesariamente con la comunicación intercelular, como en el caso de los movimientos de los tRNA a lo largo de los sitios ribosomales A-P-E durante la traducción de las proteínas. Las proteínas G heterotriméricas que participan en la transducción de señales son sólo una rama de la gran familia de proteínas que se unen a nucleótidos de guanina. Al igual que sus receptores, las proteínas G probablemente se originaron como parte de mecanismos homeostáticos para regular actividades intracelulares en eucariontes unicelulares compartamentalizados. Posiblemente los ancestros de las proteínas G sirvieron para dar especificidad al transporte intracelular de vesículas, asegurar la segregación y la distribución hacia la membrana plasmática, los lisosomas o Golgi; de hecho, algunas todavía funcionan así.

Por otra parte, varios miembros de las proteínas G tienen un papel crítico en el desarrollo del cáncer, ya que los genes codificadores de muchos

proto-oncogenes como *Ras* codifican proteínas G involucradas en la transducción de señales; al analizar las secuencias de los oncogenes obtenidos de tumores malignos y compararlas con las secuencias equivalentes de tejidos normales, se descubrieron mutaciones únicas en ciertos codones que corresponden al sitio activo de la proteína G que hidroliza GTP en GDP, por lo que estas proteínas están activas todo el tiempo y han perdido su capacidad de funcionar como interruptores. En células normales, estas proteínas funcionan en la vía de señalización que le indica a la célula crecer o no crecer en el relevo de la información recibida desde el exterior celular. Sin embargo, las versiones oncogénicas de estas proteínas son capaces de enviar una señal continua de crecimiento "corriente abajo", aun sin haber recibido mensaje alguno de los receptores.

Segundos mensajeros

Uno de los principios básicos en la transducción de las señales es la amplificación de la señal que ocurre al pasar de un componente a otro a través de las vías de señalamiento; esta amplificación se logra a través de los "segundos mensajeros". Se les llama segundos mensajeros, o mediadores intracelulares, a un grupo de moléculas pequeñas que acarrean la información codificada por los mensajeros extracelulares hacia blancos intracelulares responsables de la respuesta biológica.

Se les llama segundos mensajeros, o mediadores intracelulares, a un grupo de moléculas pequeñas que acarrean la información codificada por los mensajeros extracelulares hacia blancos intracelulares responsables de la respuesta biológica.

Para que una molécula pueda funcionar como segundo mensajero en el proceso de señalamiento debe estar sometida a un reciclaje rápido y continuo; en la mayoría de los casos los segundos mensajeros tienen vida media corta y son rápidamente degradados y resintetizados, esto es, las células poseen mecanismos para degradar eficientemente nucleótidos cíclicos, y para amortiguar y mover el calcio citosólico, por ejemplo. En las cascadas de amplificación de una señal, se necesitan mecanismos que equilibren las señales estimulatorias para restablecer el sistema a su estado de reposo cuando la estimulación cesa, por lo que en tejidos adultos generalmente, cuando la señal se apaga, la respuesta también.

La interacción del ligando a sus receptores (varios de estos miembros de la familia de siete dominios transmembranales y otros miembros del grupo de receptores con actividad enzimática intrínseca), activa a las proteínas efectoras que se encuentran cerca de la membrana, lo que les permite catalizar la transformación de moléculas precursoras en segundos mensajeros; éstos funcionan como efectores alostéricos, es decir, son reconocidos con una extraordinaria afinidad y especificidad por ciertas proteínas cinasas las que a su vez fosforilan otras proteínas de la célula, activando o inhibiendo otras cinasas o fosfatasas; cuando alguna de estas cinasas tiene varias proteínas blanco, la vía de señalamiento se ramifica, contribuyendo de esta forma a una cascada de eventos que amplifican la señal al interior de la célula y contribuyen a la diversidad de respuestas celulares.

Dos de los segundos mensajeros más ampliamente usados por las células son el AMP cíclico y el Ca^{+2}; los cambios en la concentración de estos mensajeros intracelulares son estimulados por distintas vías y la mayoría de

los receptores acoplados a proteínas G regulan uno u otro sistema. La incorporación y utilización de glucosa, el almacenamiento y movilización de grasas y la secreción de productos celulares son ejemplos de funciones metabólicas controladas por la inducción de segundos mensajeros.

Segundo mensajero: AMP *cíclico*

El AMP cíclico fue identificado como un mediador intracelular de acción hormonal a finales de la década de 1950.

El AMP cíclico fue identificado como un mediador intracelular de acción hormonal a finales de la década de 1950 y se ha establecido que tiene esta función tanto en células procariontes como en eucariontes.

Para actuar como segundo mensajero, el nivel de AMP cíclico es capaz de subir o bajar considerablemente en respuesta a estímulos extracelulares (hasta cinco veces en unos cuantos segundos); esta capacidad está mediada por la rápida síntesis de la adenilato-ciclasa y equilibrada con una rápida hidrólisis por una o varias AMP cíclico-fosfodiesterasas; sin embargo, los mensajeros extracelulares funcionan controlando los niveles de AMP cíclico, alterando la actividad de la adenilato-ciclasa más que de las fosfodiesterasas. El sistema más estudiado de receptores acoplados a la activación de la adenilato-ciclasa es el grupo de receptores β adrenérgicos que son los mediadores de la acción de la epinefrina y norepinefrina (figura 7-10).

En este sistema, una misma molécula mensajera, epinefrina, puede incrementar o disminuir la concentración de AMP cíclico, dependiendo del tipo de receptor al que se enlaza. Cuando se enlaza a receptores β-adrenérgicos, por ejemplo, activa la adenilato-ciclasa, mientras que, si se enlaza a uno α_2-adrenérgico, la inhibe. Esta diferencia se debe al tipo de proteína G a la que funcionalmente se encuentran acoplados los distintos receptores: los β-adrenérgicos se relacionan con la adenilato-ciclasa a través de una proteína G_s (s del inglés *stimulatory*) y los α_2-adrenérgicos se asocian a la adenilato-ciclasa a través de una proteína G_i inhibitoria. En forma análoga a la discutida para la rodopsina, en este sistema se logra también una gran amplificación de la señal original, ya que la activación de un solo receptor puede activar cientos de $G_s\alpha$ y éstas a su vez un gran número de ciclasas.

En células animales, el AMP cíclico ejerce sus acciones activando una enzima: la proteína cinasa A dependiente del AMP cíclico o PKA (del inglés: *Protein Kinase cAMP dependent*), la cual cataliza la transferencia del grupo fosfato γ del ATP a residuos específicos de serina o treonina de otras proteínas, esta fosforilación covalente regula la actividad de las proteínas fosforiladas. La PKA se encuentra en todas las células animales y se cree que es la responsable de la mayoría de los efectos del AMP cíclico; sin embargo, los sustratos de la PKA difieren en las distintas estirpes celulares, lo que explica por qué las respuestas varían tanto de célula a célula. Por ejemplo, en hígado, un aumento de AMPc activa a la PKA, la cual puede estimular la degradación de glucógeno a glucosa, o en corazón aumenta la frecuencia cardiaca y la fuerza de contracción. En algunas células animales, un incremento en el AMP cíclico activa la transcripción de genes específicos; por ejemplo, las células que secretan la somatostatina lo hacen al aumentar los niveles de AMP cíclico, debido a que las regiones reguladoras del gen de

somatostatina contienen unas secuencias pequeñas de DNA llamadas *CRE* (del inglés: ***c****iclic AMP* ***r****esponse* ***e****lements*), que también se encuentran en regiones reguladoras de otros genes activados por AMP cíclico. Estas secuencias son reconocidas por una proteína reguladora de la expresión genética llamada proteína *CREB* (*CRE binding*). Cuando esta proteína es fosforilada por PKA, se activa e inicia la transcripción de los genes que contienen estas secuencias.

Debido a que ha sido muy difícil reconstituir las vías de señalamiento por la complejidad y la redundancia de las redes de comunicación intracelular, se ha utilizado esta estrategia basada en la identificación de los genes inducidos por alguna señal extracelular, posteriormente se han identificado las secuencias reguladoras en el DNA de estos genes a las que los factores de transcripción específicos se acoplan, de esta manera se han reconocido más elementos y se espera conocer la organización detallada de las vías de transducción en general.

Segundo mensajero: Ca^{++}

Las primeras evidencias de que el calcio funciona como un segundo mensajero se publicaron en 1947.

Las primeras evidencias de que el calcio funciona como un segundo mensajero se publicaron en 1947, cuando se provocaron contracciones de células de músculo esquelético al inyectarles calcio intracelularmente. Recientemente ha quedado establecido que el calcio funciona como segundo mensajero en procesos tan diversos como la secreción y la proliferación. El mecanismo de acción de esta molécula tiene que ver con la diferencia de concentración intra y extracelular que existe de este catión. La concentración de calcio libre en el citosol es muy baja, 10^{-7} M, mientras que la concentración extracelular es más alta, 10^{-3} M, por lo que existe un gradiente con una tendencia a empujar el calcio hacia el interior celular. Cuando alguna señal abre transitoriamente los canales que permiten el paso del calcio, el nivel del calcio citosólico aumenta dramáticamente activando las proteínas que responden a este ion. Existen dos vías de señalamiento del calcio, una usada por células excitables y otra usada por casi todas las demás células eucariontes. En el caso de la células excitables, la despolarización de la membrana plasmática induce la entrada de calcio al interior celular y produce la secreción de neurotransmisores. En la vía usada por células no excitables, el enlace de un ligando a sus receptores de superficie provoca la liberación de calcio de los depósitos del retículo endoplásmico; esta liberación también es inducida por otro segundo mensajero, el inositol trifosfato.

El aumento citosólico del calcio ejerce su acción a través de estructuras que poseen una alta afinidad específica por este catión, como es el caso de la calmodulina, que es una proteína que se ha encontrado en todas las células eucariontes estudiadas y cuya función es la de ser un receptor de calcio intracelular multipropósitos, responsable de mediar la mayoría de los efectos del aumento de calcio. Es un polipéptido de aproximadamente 150 aminoácidos altamente conservados entre especies y con cuatro sitios de enlace de calcio. La activación alostérica de calmodulina por calcio provoca

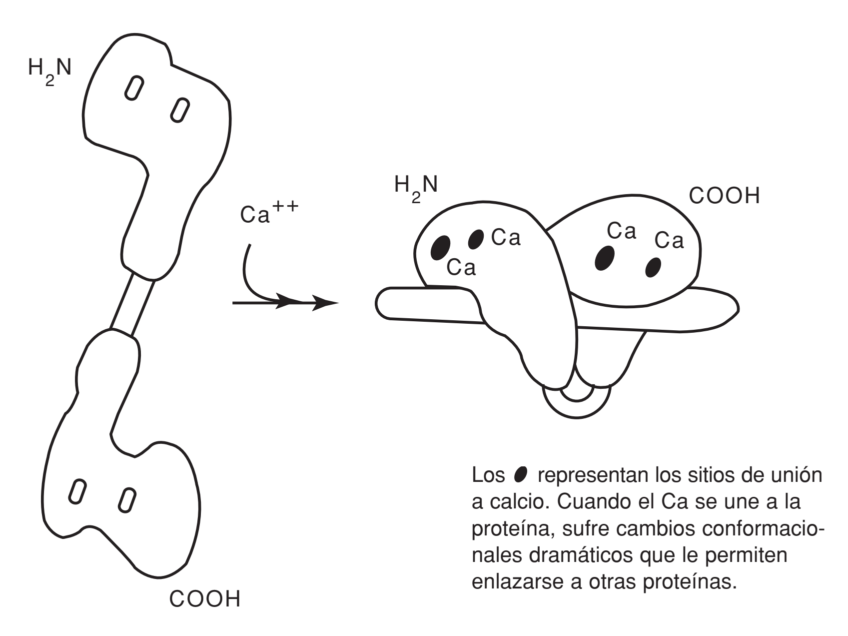


Figura 7-11. Esquema de calmodulina.

cambios conformacionales dramáticos sobre la proteína y es semejante a la ocurrida por AMP cíclico sobre PKC, excepto que la calmodulina no es una proteína cinasa; la calmodulina actúa uniéndose a otras proteínas, las más de las veces funcionando como una subunidad reguladora de complejos enzimáticos (figura 7-11).

Entre las proteínas blanco reguladas por Ca^{+2}/calmodulina hay varias enzimas como las cinasas dependientes de Ca^{+2}/calmodulina o los transportadores de membrana, como la ATPasa de calcio que bombea Ca^{+2} fuera de la célula al enlazar el complejo Ca^{+2}/calmodulina. La mayoría de los efectos del calcio, sin embargo, están mediados por fosforilaciones proteicas catalizadas por las proteínas cinasas dependientes de Ca^{+2}/calmodulina conocidas como cinasas CaM (del inglés: **Ca**-cal**m**odulin-dependent). Estas cinasas fosforilan residuos serina/treonina en otra proteínas, y la respuesta de una célula blanco al aumento citosólico de calcio depende de cuáles proteínas fosforilables dependientes de cinasas CaM posee.

Segundo mensajero: IP_3

Uno de los sistemas de transducción de señales mejor conocido en la actualidad es la *vía de recambio de fosfoinosítidos*.

Uno de los sistemas de transducción de señales mejor conocido en la actualidad es la *vía de recambio de fosfoinosítidos*.

En la década de 1950, se encontró que ciertos mensajeros extracelulares estimulaban la incorporación de fosfato radiactivo en fosfatidilinositol, un componente menor de las membranas plasmáticas (constituyente menor de 1% del total de fosfolípidos en las membranas). Posteriormente se demostró que esta incorporación se debía a la degradación y resíntesis de los fosfolípidos de inositol a través de la fosfolipasa C, siendo la hidrólisis

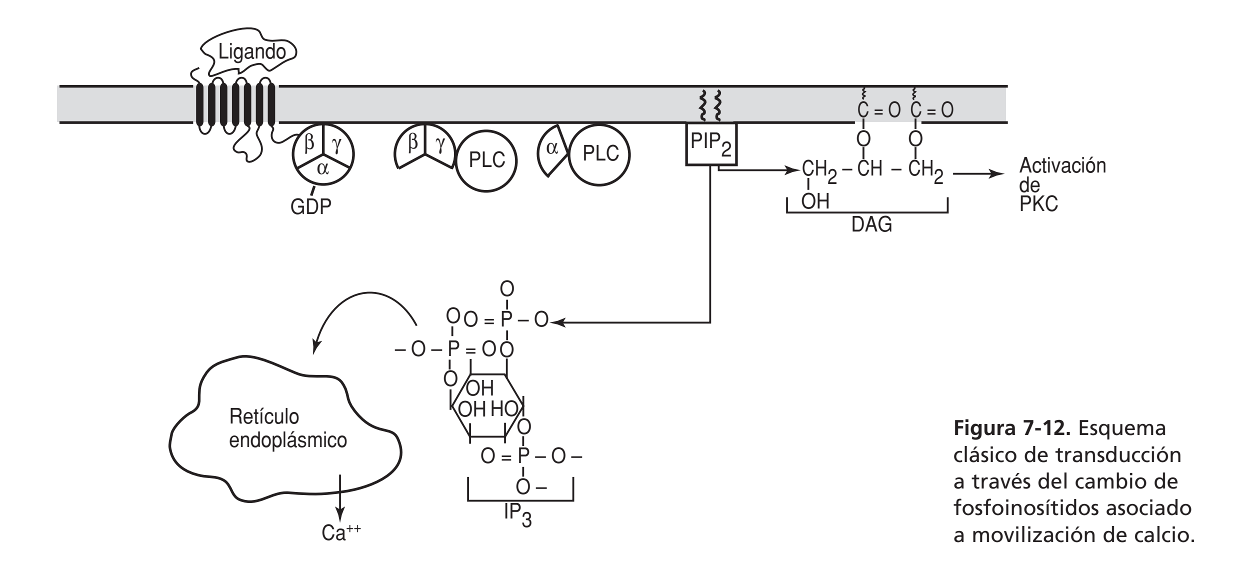


Figura 7-12. Esquema clásico de transducción a través del cambio de fosfoinosítidos asociado a movilización de calcio.

del fosfatidilinositol-4,5,-bifosfato (PIP_2) para producir inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol uno de los eventos más importantes en la transducción de señales (figura 7-12).

Este esquema clásico se ha ampliado al incluir otros lípidos de membrana que también pueden generar segundos mensajeros a través de diferentes fosfolipasas (figura 7-13) al quedar demostrado que varios ligandos movilizadores de calcio también pueden inducir, a través de las fosfolipasas A_2 y D, hidrólisis rápida de la fosfatidilcolina que es otro lípido de membranas mucho más abundante que el PIP_2.

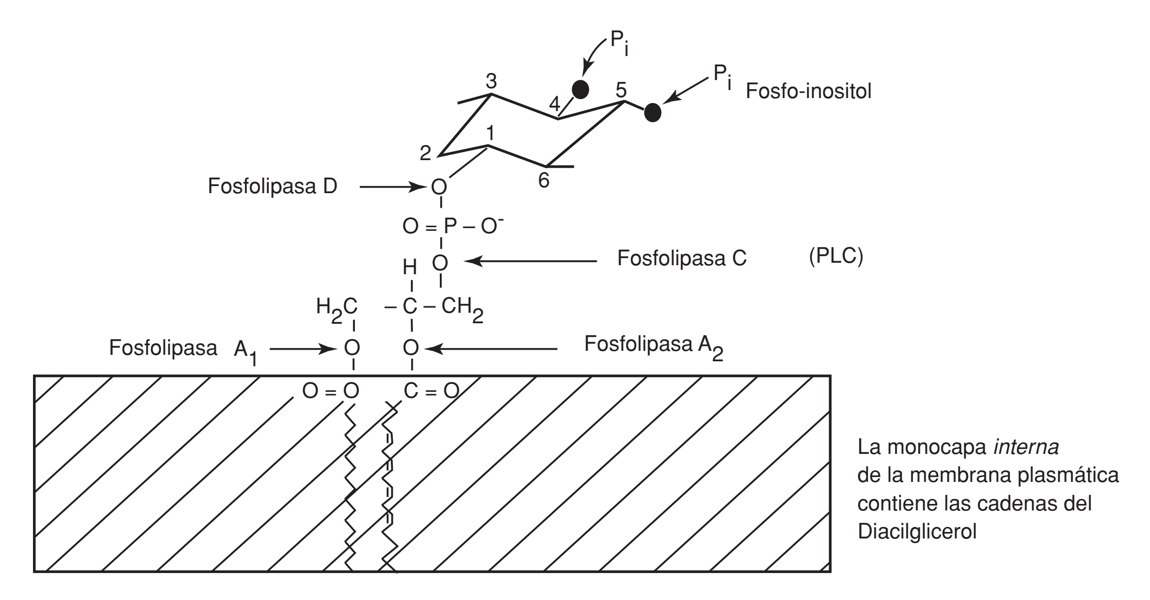


Figura 7-13. Esquema que muestra la posición de los enlaces ésteres del fosfatidilinositol bifosfato hidrolizables por diversas fosfolipasas.

La cadena de eventos que llevan a la hidrólisis de PIP_2 se inicia con el enlace de un mensajero extracelular a un receptor de membrana plasmática acoplado generalmente a una proteína G; en la actualidad, se han descrito más de 25 receptores de superficie que utilizan esta vía de transducción. La interacción de un ligando a su receptor activa a una proteína G y ésta a su vez activa a una proteína efectora: la fosfolipasa C; en una fracción de segundo esta enzima rompe al PIP_2 para generar dos productos que funcionan como segundos mensajeros: inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol.

En este punto la cascada de señalamiento se divide en dos de acuerdo con los efectos de estos dos productos de hidrólisis:

Por un lado el IP_3 es una molécula pequeña soluble en agua, que deja la membrana plasmática y se difunde rápidamente a través del citosol y, cuando llega al retículo endoplásmico, libera calcio al enlazarse a canales de compuerta liberadores de calcio. Este tipo de canales son regulados por una retroalimentación positiva, en la que el calcio se enlaza a otros canales, incrementando su liberación, haciendo que el fenómeno de liberación sea un fenómeno de todo o nada. Para terminar la respuesta al calcio liberado, el calcio es bombeado principalmente fuera de la célula y se activan proteínas-fosfatasas específicas que desfosforilan IP_3; sin embargo, no todo el IP_3 es desfosforilado, una fracción es fosforilada a IP_4 (1,3,4,5-tetracisfosfato de inositol), molécula que puede mediar respuestas a mediano y largo plazos en la célula y promover además la reposición del calcio en sus compartimentos intracelulares.

Por otro lado, y al mismo tiempo que todos estos efectos producidos por el IP_3 están ocurriendo, el otro producto generado de la hidrólisis de PIP_2, el diacilglicerol, está ejerciendo sus efectos: activa por una parte a una cinasa de serinas/treoninas crítica, llamada proteína cinasa-C o PKC, la cual es responsable de fosforilar proteínas clave en la respuesta celular final y, por otra parte, puede romperse aún más y producir ácido araquidónico, el cual puede funcionar como un segundo mensajero o ser usado en la síntesis de eicosanoides (prostaglandinas y tromboxanos). El aumento inicial en la concentración de calcio modifica a la PKC, trasladándola a la cara citoplásmica de la membrana. Ahí es activada por una combinación de Ca^{+2}, diacilglicerol y fosfatidilserina (un fosfolípido de membrana cargado); de las ocho isoformas que se conocen de la PKC, cuatro son activadas por el diacilglicerol. Las concentraciones más altas de esta enzima se han encontrado en el cerebro, en donde, entre otros sustratos, fosforila canales iónicos en células nerviosas, modificando sus propiedades y alterando la excitabilidad de la membrana plasmática de las células nerviosas. En muchas otras células, la activación de la PKC incrementa la transcripción de genes específicos.

La adición de ciertos fármacos en células intactas puede emular los efectos de las dos vías de señalamiento, la producida por IP_3 y la producida por diacilglicerol. Los efectos de IP_3 pueden ser evocados introduciendo calcio a través de un ionóforo (un compuesto que al integrarse en la membrana plasmática crea un canal), el cual permite el paso directo del calcio al interior celular. Y los efectos del diacilglicerol pueden ser evocados por ésteres de forbol, que son producidos por ciertas plantas que activan directamente a la PKC. El empleo de estos agentes como herramientas expe-

rimentales ha permitido analizar y demostrar que estas dos ramas de señalamiento del PIP_2 frecuentemente colaboran en la producción de la respuesta celular total.

Segundo mensajero: óxido nítrico

Aunque la mayoría de los segundos mensajeros son hidrosolubles, ciertos mensajeros como el óxido nítrico (ON) o el CO_2 son lo suficientemente pequeños para atravesar la membrana plasmática y regular directamente la actividad de proteínas intracelulares. Un mensajero químico, la acetilcolina, actúa indirectamente sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos, induciéndolas a liberar óxido nítrico, el cual a su vez indica a las fibras del músculo liso que recubren los vasos sanguíneos a relajarse; éste es el mecanismo de acción de la nitroglicerina usada desde hace varias décadas en el tratamiento del dolor por falta de irrigación cardiaca (isquemia); debido a que este compuesto es convertido en óxido nítrico, la relajación consecuente de los vasos sanguíneos tiene como efecto la disminución del esfuerzo cardiaco. El óxido nítrico también es producido como mediador local por macrófagos y neutrófilos activados durante infecciones por microorganismos. El óxido nítrico es sintetizado por la óxido-nítrico-sintasa a partir de la desaminación del aminoácido arginina; una vez producido, se difunde rápidamente a través de las membranas y afecta a las células vecinas; actúa localmente debido a que tiene una vida media muy corta (5 a 10 segundos); además, en muchas células blanco el óxido nítrico reacciona con el hierro del sitio activo de la enzima guanilato-ciclasa, estimulándola a producción de GMP cíclico, otro segundo mensajero.

Ciertos mensajeros como el óxido nítrico (ON) o el CO_2 son lo suficientemente pequeños para atravesar la membrana plasmática y regular directamente la actividad de proteínas intracelulares.

Fosforilación/desfosforilación (PKA, PKC, fosfatasas)

Además de su importante papel en la activación de receptores con actividad de cinasas, la fosforilación a través de cinasas de proteínas representa nodos críticos para la transmisión, amplificación y distribución de las señales. El estado de fosforilación de los residuos tirosina, serina y treonina son una de las principales señales reguladoras en el citoplasma de células eucariontes. Los mecanismos a través de los cuales las cinasas involucradas en la transducción de señales funcionan, se entienden mejor a través de varios ejemplos mediados por segundos mensajeros como el diacilglicerol, Ca^{+2} y AMPc:

La activación de la proteína cinasa C (PKC), por ejemplo, se logra cuando el diacilglicerol se acopla a la región reguladora de la proteína, desencadenando un cambio conformacional en su estructura y exponiendo así el sitio activo.

En el caso de la cinasa dependiente de calcio-calmodulina, la proteína es inactiva a menos que se le una el complejo calcio-calmodulina, el cual, debido a la inducción de cambios conformacionales sobre la proteína, pro-

El estado de fosforilación de los residuos tirosina, serina y treonina son una de las principales señales reguladoras en el citoplasma de células eucariontes.

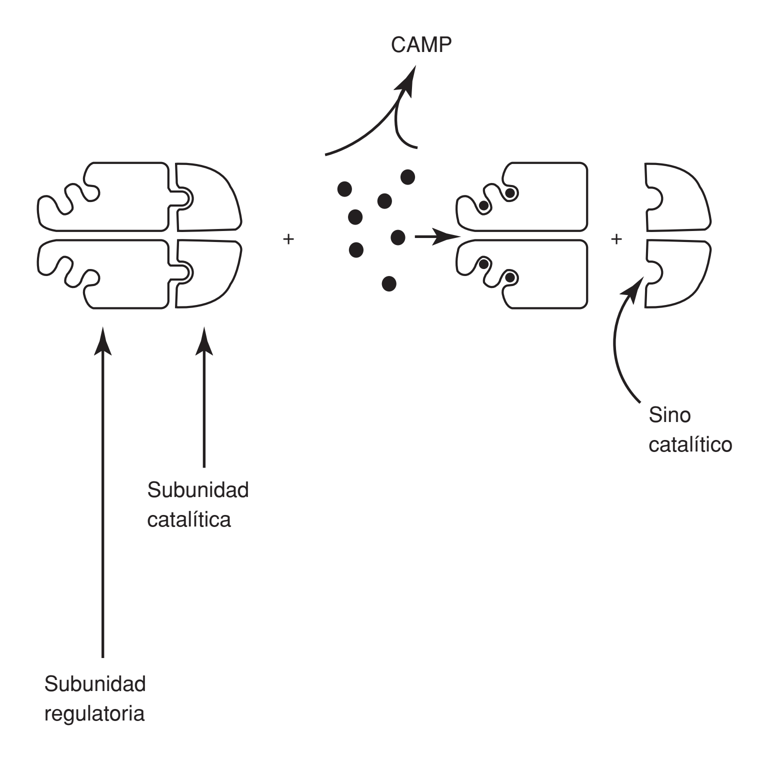


Figura 7-14. Esquema de la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc. La interacción de la subunidad regulatoria con las moléculas de AMPc separan a esta subunidad de la subunidad catalítica activándola.

duce en la enzima el desdoblamiento de un dominio inhibitorio (llamado pseudosustrato) del sitio activo.

En las cinasas dependientes de AMP cíclico, las llamadas PKA, el dominio inhibitorio se encuentra en una subunidad separada. Esta subunidad forma un complejo fuertemente unido a la subunidad catalítica (figura 7-14); sin embargo, el enlace de AMP cíclico a la subunidad inhibitoria desensambla el complejo y libera el dominio catalítico de la cinasa.

Debido a que la actividad de cualquier proteína regulada por fosforilación depende del equilibrio que hay entre las actividades de las cinasas que las fosforilan y de las fosfatasas que constantemente las desfosforilan, las fosfatasas también tienen una función importante en el campo de la transducción de señales. De hecho, hay aproximadamente 1,000 veces más actividad de fosfatasas de tirosina en el citoplasma de células animales que actividad cinasa de tirosinas. La desfosforilación de serinas/treoninas fosforiladas es catalizada por cuatro grupos de fosfatasas: I, IIA, IIB y IIC; la fosfatasa I tiene una función relevante en respuesta al AMP cíclico y, aunque han sido descritas un gran número de fosfatasas de tirosinas solubles y transmembrana, hasta hace poco no se habían demostrado funciones biológicas más directas de las fosfatasas de tirosinas en la transducción de señales; sin embargo, recientemente se demostró la existencia de receptores fosfatasas de tirosinas necesarios para la guía de axones motores en el desarrollo del embrión de *Drosophila*. Otro ejemplo notable de cómo las fosfatasas participan activamente en la transducción de señales lo constituye

la superfamilia de fosfatasas llamadas PTP. En esta superfamilia se incluyen las fosfatasas específicas de tirosinas, las de especificidad dual, las de peso molecular bajo y las fosfatasas Cdc 25. Estas enzimas son mediadores críticos de una gran variedad de procesos celulares, que incluyen: crecimiento, metabolismo, diferenciación, movilidad y apoptosis. Los estudios sobre PTEN, una fosfatasa con similaridad a PTP, han establecido su preponderante papel en el crecimiento celular y en apoptosis al encontrarse mutaciones en este gen que promueven la formación de tumores en diversos tejidos humanos. El gen de PTEN se encuentra en el cromosoma 10q23, un *locus* involucrado en varios cánceres, y se han encontrado mutaciones germinales en PTEN, lo que convierte a este gen en un gen supresor de tumores. Estas mutaciones germinales son determinantes en la aparición de ciertos síndromes familiares; los pacientes afectados tienen un gran riesgo de desarrollar cáncer de mama y de tiroides. Los estudios bioquímicos de la fosfatasa PTEN han revelado los probables mecanismos de estos procesos tumorigénicos. PTEN usa como segundo mensajero fosfatildil-inositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) como su sustrato fisiológico. Este lípido de inositol es un regulador de crecimiento y de señales de sobrevivencia celular provenientes de los receptores-cinasa de serinas y treoninas, llamados PDK1 y Akt. PTEN funciona desfoforilando la posición D3 de PIP3, regulando negativamente los procesos de señalización "corriente abajo" de este segundo mensajero (PIP3). Las mutaciones que impiden el funcionamiento de PTEN tienen como resultado un aumento importante en los niveles de PIP3 y, por lo tanto, una activación constitutiva de las señales de sobrevivencia mediadas por Akt, lo cual lleva a una inhibición del proceso apoptótico.

Dominios SH1, SH2 y SH3 y proteínas modulares acopladoras

Otra estrategia para llevar los mensajes químicos desde la superficie celular hasta el núcleo es el empleo de las interacciones proteína-proteína. Estas interacciones pueden ocurrir a través del reconocimiento y contacto de ciertas estructuras modulares o dominios comunes en proteínas distintas; estos módulos conectan distintos componentes "corriente arriba" y "corriente abajo" involucrados en la vía de señalamiento. Además del reconocimiento estructural, la activación puede depender de la presencia de uno o más fosfatos en estos módulos; del mismo modo, al perder los grupos fosfatos estos módulos se inactivan y la señal decae. Estos módulos o dominios, llamados SH1, SH2 y SH3, fueron nombrados por su semejanza con las estructuras de una proteína llamada *src* ("***s**rc **h**omology* 1", etc.). El gen de la proteína *src* fue identificado inicialmente como parte del genoma de un virus que produce tumores en pollos y, debido a que este tipo de elementos genéticos son los responsables de la capacidad de muchas partículas virales para producir tumores, se les llama oncogenes. Hoy en día se sabe que los dominios SH1 son el centro catalítico de las cinasas de tirosina; los dominios SH2 reconocen y se anclan a residuos tirosina-fosforilados flanqueados por cierto contexto de aminoácidos, por lo que una proteína que contenga estructuras

SH2 tiene la capacidad de enlazarse a diferentes fosfoproteínas, evento que frecuentemente las activa, ya sea iniciando actividades enzimáticas como cinasas, fosfatasas o fosfolipasas; existen otros dominios funcionalmente equivalentes a SH2, llamados PTB (***p**hospho**t**yrosin **b**inding*), y se diferencian de los primeros por el lugar de los aminoácidos que le dan el contexto de reconocimiento; en el caso de los dominios SH2, son los aminoácidos localizados en el lado carboxilo-terminal del residuo tirosina-fosforilado los que determinan el contexto de reconocimiento; en el caso de los dominios PTB, este contexto de reconocimiento está determinado por los residuos del lado amino-terminal; los dominios SH3 reconocen y se asocian con motivos estructurales ricos en prolinas, y se ha propuesto que la presencia de esta estructura provee a la proteína, que también posea un dominio SH2, una función efectora al contactar un componente "corriente abajo" cuando previamente el dominio SH2 reconozca a los residuos fosforilados (figura 7-15).

El mecanismo de funcionamiento de estos dominios se inicia con la activación por el ligando de un receptor con actividad cinasa de tirosina; esta cinasa autofosforila residuos tirosina fuera del dominio SH1 del receptor; estos residuos fosfotirosina sirven como sitio de reconocimiento y anclaje para proteínas que contienen dominios SH2 descritos con anterio-

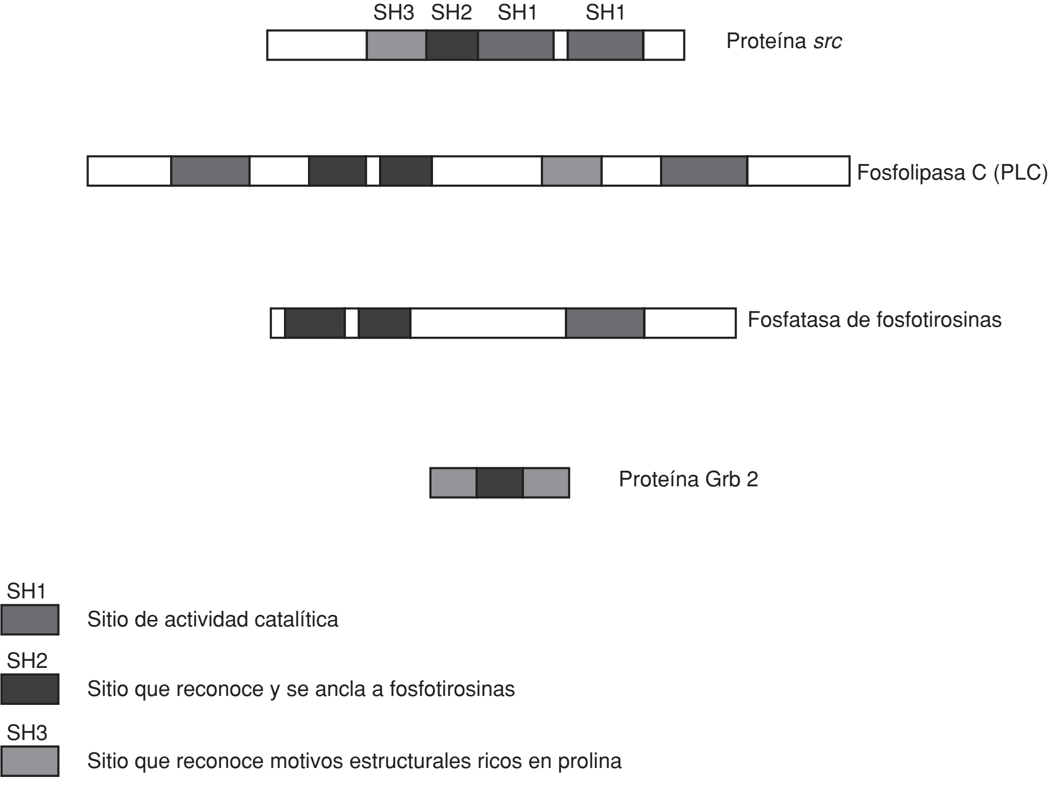


Figura 7-15. Esquema de algunas moléculas involucradas en señalamiento intracelular con dominios semejantes a los de la proteína *src*.

ridad. Las proteínas con dominios SH2 pueden o no tener actividades enzimáticas o funcionar como proteínas adaptadoras que conectan al receptor activado a través de un dominio SH3 con otras enzimas generadoras de señales auténticas.

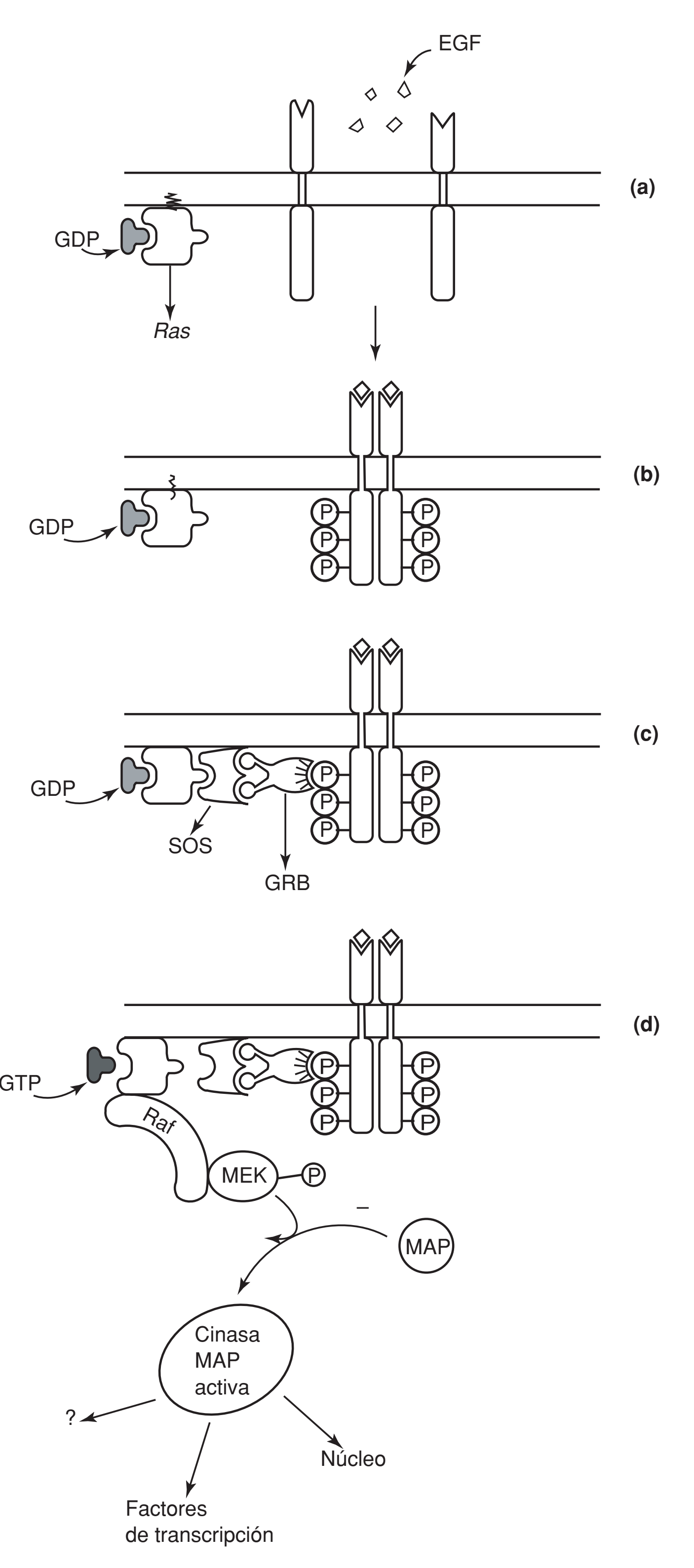
Se ha demostrado que el funcionamiento de estos dominios proteicos organiza y regula redes de interacción muy versátiles, además de indicar cuál es el camino al núcleo desde la superficie celular; también participan en el tráfico de proteínas y su localización subcelular así como en el control de la arquitectura celular.

Ejemplo 1: Vía de señalamiento *Ras*

Esta vía de señalamiento (figura 7-16) toma su nombre de uno de sus componentes y, en mamíferos, varios de estos componentes están relacionados con oncogenes, lo que sugiere que una activación aberrante de esta vía de señalamiento tiene el potencial de producir tumores. En términos bioquímicos, han sido caracterizados los componentes de este sistema involucrados en procesos tan diversos como el crecimiento de células de mamíferos en cultivo, en el desarrollo del ojo de *D. melanogaster*, en el desarrollo de la vulva de *C. elegans* y en el proceso de apareamiento de la levadura de *Saccharomyces cerevisiae*.

Una característica sobresaliente de esta vía es que puede ser activada a través de diversas formas y tiene distintos efectos. Se trata de una cascada de señales que es empleada para conectar en el inicio un estímulo apropiado, con una respuesta efectora al final. Aunque no se conocen todos los detalles y las ramificaciones del sistema, el esquema general está bastante definido.

En células de mamíferos, la cascada se inicia en la membrana plasmática por la activación de receptores con actividad cinasa de tirosina debido al enlace con su ligando, típicamente EGF (del inglés ***e**pidermal **g**rowth **f**actor*) o PDGF (***p**latelet **d**erived **g**rowth **f**actor*). Estos receptores activados se asocian con una proteína adaptadora llamada Grb2 (figura 7-16) a través de sus dominios SH2; a través de sus dominios SH3, se asocia con otra proteína llamada SOS, que es una proteína intercambiadora de GDP por GTP; cuando SOS se encuentra activada, se acerca a la membrana y esta cercanía es suficiente para activar el intercambio de GTP por GDP a *Ras,* que es una proteína G monomérica (activa sólo cuando tiene enlazado GTP) y que se encuentra adosada a la membrana plasmática a través de un grupo farnesilo. Cuando *Ras* está activa entra en contacto con otra proteína llamada *Raf* atrayéndola del citosol a la membrana plasmática e indirectamente induciendo su fosforilación; la cinasa responsable de este evento no se ha identificado aún. La fosforilación de *Raf* la activa y esta activación lleva a la fosforilación de otra enzima llamada MEK, que es una cinasa que fosforila tanto residuos tirosina como treonina y su sustrato es otra cinasa llamada ERK/MAP. A partir de este punto todos los episodios de activación se deben a la actividad de cinasas de residuos serina/treonina.



a, b) El enlace del ligando EGF induce homodimerización de sus receptores y autofosforilación.

c) Los residuos fosforilados funcionan como sitio de reclutamiento para la proteína adaptadora Grb_2 a través de su dominio SH2. A través de sus dominios SH3, Grb_2 recluta a SOS que facilita la disociación de GDP de *Ras* activándolo.

d) *Ras* activa se asocia a *Raf* y *Raf* fosforila a Mek y ésta a su vez fosforila a MAP que al activarse fosforila a varios sustratos algunos responsables del cambio en la transcripción genética.

Figura 7-16. La vía de *Ras*.

En la vía clásica, las cinasas ERK/MAP se translocan al núcleo donde fosforilan factores de transcripción blanco como c-Myc, Elk-1 o c-Jun, lo que lleva a un cambio en el patrón de transcripción. En una vía alternativa, las cinasas ERK/MAP fosforilan factores citoplásmicos que luego se translocan al núcleo, modificando la transcripción, o fosforilan otras cinasas como *Rsk* que extienden la cascada a lo largo de otras ramificaciones. Esta cascada es la mejor caracterizada, aunque hay cascadas paralelas que interaccionan también con los componentes descritos, como es el caso de otra cinasa que también fosforila a MEK y es llamada MEKK (del inglés *MEK **k**inase*). Es importante destacar el grado de amplificación que la señal puede alcanzar en esta vía, se ha estimado que en cada paso de la cascada de cinasas la señal se amplifica 10 veces, por lo que la amplificación final alcanzada es mayor que 10^4, lo que significa que la vía se puede activar aun con señales muy débiles. Se ha calculado que las cinasas ERK/MAP están totalmente activadas; cuando menos de 5% de las proteínas *Raf* se han enlazado a *Ras*.

Otra de las características más sobresalientes de estas vías de transducción es que divergen y convergen en distintos puntos, lo que permite respuestas distintas que se sobrelapan o que se inician en distintas circunstancias. La divergencia puede originarse con el episodio inicial, ya que un ligando puede activar simultáneamente varias vías; por ejemplo, el EGF puede activar simultáneamente la vía de *Ras* y vías independientes de *Ras* que inducen segundos mensajeros. Y las convergencias se ilustran con la capacidad que tienen varias vías de activar las cinasas ERK/MAP y el consecuente cambio en el patrón de genes transcritos.

Ejemplo 2: Vía de señalamiento de las JAK/STAT

Los receptores del subgrupo IL/IFN/eritropoyetina/hormona del crecimiento de citocinas carecen de actividad catalítica intrínseca; no obstante, su mecanismo de señalamiento se basa en una elegante y sencilla combinación de cinasas de tirosina y módulos acopladores del tipo de los dominios SH2. Un ejemplo representativo es el de los interferones, los cuales al unirse a sus receptores propician su dimerización, acercando con ello sus regiones intracelulares, en las cuales se encuentra unida (no covalentemente) una cinasa de proteínas de la familia de las JAK. El acercamiento de las JAK resulta en su autofosforilación y en la fosforilación cruzada de ciertas tirosinas del receptor. Estos últimos ahora pueden funcionar como sitios de anclaje para proteínas de la familia de las STAT. La unión de las STAT al receptor, mediante sus dominios SH2, permite que sean fosforiladas por las JAK, generando así una fosfotirosina que ocasiona la dimerización de las STAT a través de sus dominios SH2. En el estado dimérico, las STAT cambian hacia una conformación activa que les permite migrar al núcleo celular y funcionar ahí como reguladores transcripcionales de los genes con el control de los interferones (figura7-17). La especificidad de la señal de cada citocina se logra por una combinación específica de receptor/JAK/STAT. Las cinasas JAK son una familia de cinasas de proteínas y cada miembro interacciona

Las cinasas JAK son una familia de cinasas de proteínas.

con y fosforila específicamente a un receptor. A su vez, cada STAT reconoce específicamente un receptor fosforilado y se une a él, situándose como sustrato de una JAK en particular.

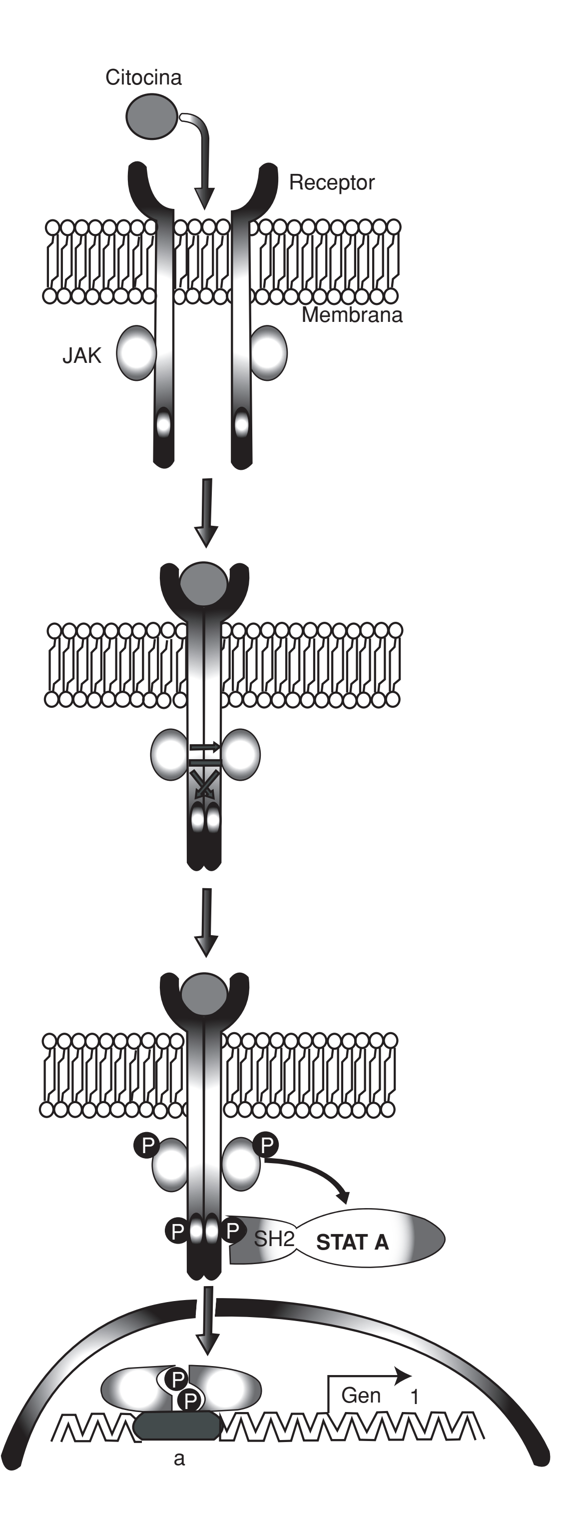


Figura 7-17. Vía de señalamiento JAK/STAT.



Receptores nucleares

Los ligandos liposolubles incluyen: cortisol, hormonas esteroideas (sexuales y mineralocorticoides), hormonas tiroideas, retinoides y vitamina A (figura 7-18). Son moléculas pequeñas que difieren mucho entre ellas tanto en estructuras químicas como en funciones. Sin embargo, todas ellas funcionan a través de mecanismos semejantes: su hidrofobicidad les permite difundir directamente a través de las membranas de las células blanco y enlazarse con receptores intracelulares. El enlace de los ligandos activa a los receptores, los cuales migran al núcleo, en donde funcionan como reguladores de la transcripción de los genes blanco (figura 7-19).

Figura 7-18. Estructuras químicas de varios ligandos que se enlazan a receptores intracelulares.

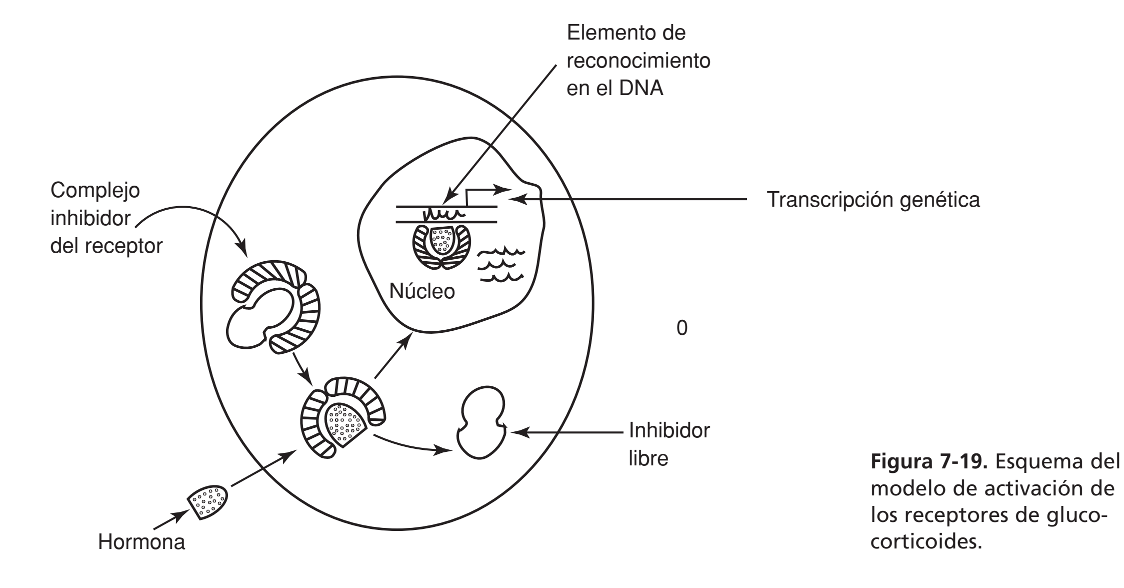


Figura 7-19. Esquema del modelo de activación de los receptores de glucocorticoides.

Aunque los ligandos liposolubles son relativamente insolubles en agua, se hacen solubles al ser transportados en el torrente sanguíneo y otros líquidos extracelulares, acoplándose a proteínas acarreadoras, de las cuales se disocian y pasan al interior celular directamente a través de la membrana plasmática. Estas moléculas también se diferencian de las solubles en agua por el tiempo que persisten en circulación y otros líquidos intersticiales. La mayoría de las hormonas hidrosolubles desaparecen de circulación o son degradadas a los minutos de haber entrado en circulación; los mediadores locales o los neurotransmisores, dentro de segundos o milisegundos. En contraste, las hormonas esteroideas persisten por horas y la hormona tiroidea por días. De esta manera los mensajeros hidrosolubles tienden a mediar fenómenos o respuestas de corta duración, mientras que las insolubles en agua tienden a mediar respuestas de largo plazo.

Estos receptores intracelulares reconocen secuencias de DNA específicos, adyacentes a los genes que estas hormonas regulan. Algunos de estos receptores se encuentran en el citosol como el caso de los receptores a cortisol y después de reconocer al ligando se translocan al núcleo, otros en cambio se encuentran en el núcleo como los receptores de retinoides e incluso reconocen las secuencias del DNA en ausencia del ligando. En muchos casos la respuesta ocurre en dos fases:

1. La respuesta primaria que corresponde a la inducción directa de la transcripción de un número pequeño de genes específicos dentro de los 30 minutos posteriores al enlace del ligando al receptor.
2. Los productos de estos genes a su vez activan otros genes, lo que se conoce como respuesta secundaria.

La respuesta primaria es gradual y sigue un patrón directamente proporcional a la concentración del ligando, probablemente debido a que el receptor intracelular enlaza una sola molécula de hormona y cada secuencia de reconocimiento en el DNA de genes que responden a estas hormonas actúan independientemente.

Recientemente han sido identificadas y mapeadas las regiones del DNA de los genes que tienen la capacidad de responder específicamente a hormonas, resultando ser secuencias reguladoras que flanquean a estos genes a unos 15 pb del inicio de la transcripción y a las cuales se les ha denominado HRE (***h**ormone **r**esponse **e**lements*). Los complejos hormonas esteroideas-receptores se unen específicamente a estas regiones reguladoras. Así, los receptores para estas hormonas cumplen una función doble: funcionan como receptores citoplásmicos de la señal tanto como efectores nucleares al activar o reprimir en ciertos casos la transcripción de ciertos genes blanco.

Las respuestas a estos mensajeros, como a todos los mensajes extracelulares en general, están determinadas por el contexto bioquímico intracelular de las células blanco, así como la naturaleza de la molécula señaladora. Por ejemplo: aun cuando las células de distinto linaje posean un receptor intracelular idéntico, el grupo de genes que el receptor activado regula es distinto en cada célula, esto es debido a que un receptor intracelular puede activar un gen solamente, si esa célula contiene la combinación adecuada

de proteínas reguladoras para iniciar la transcripción y algunas de estas proteínas reguladoras son específicas de cada estirpe celular.



Comentario final

La cantidad de señales químicas que reciben las células de organismos multicelulares es grandísima y determinan o alteran muchas funciones celulares: el estado metabólico y de diferenciación de las células, si se dividen o no, si se mueven o si cambian de forma o si viven o mueren. Estos mensajes codificados en mensajeros químicos, que generalmente se enlazan a receptores de superficie, activan varias vías de señalamiento intracelular, de tal manera que varias vías generadas por diversos receptores interactúan unas con otras de forma compleja. Estas vías de señalización forman retículas o redes altamente interconectadas, en las cuales las señales son procesadas a lo largo de rutas paralelas y ramificadas, interactuando unas con otras y produciendo lo que conocemos como las respuestas celulares. Las complejidades de estas interacciones son demasiado grandes para visualizarse fácilmente y en el presente estamos aún muy lejos de entenderlas completamente.

En el futuro y a medida que haya disponibles más y más datos acerca de los protagonistas y las dinámicas internas de estas vías de señalamiento, es probable que sean los sistemas de simulaciones computarizadas los que ayuden significativamente a entender cómo es que estas complicadas redes operan.



Referencias bibliográficas

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*, 4a. ed., *Garland Science*, Nueva York, 2002.

Avruch, J.; Zhang, X.F. y Kyriakis, J.M., "Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway", *Trends in Biochem. Sci*., **19:** 279-283, 1994.

Gerhart, J. y Kirschner, M., *Cells, embryos and evolution.* Toward a cellular and developmental understanding of phenotypic variation and evolutionary adaptability, Blackwell Science, Inc., Mass., USA, 1997.

García-Sainz, J. A. (1991). Hormonas: mensajeros químicos y comunicación celular. Fondo de Cultura Económica, México.

Lewin, B., *Genes VII*, Oxford University Press, 1999.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, P.; Matsudaira, P. y Darnell, J., *Molecular Cell Biology,* 4a. ed. Media Connected W.H. Freeman and Co., Nueva York, 2000.

Ulrich, A. y Schlessinger, J., "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity", *Cell,* **61:** 203-212, 1990.

CAPÍTULO 8

LOS CONTACTOS INTERCELULARES

Lorenza González Mariscal ■ Antonia Ávila Flores
Mirna Alicia Pérez Moreno ■ Abigail Betanzos Fernández
Socorro Islas Mendoza

Introducción

La característica fundamental de las células epiteliales polarizadas es regular el paso de iones y moléculas entre dos compartimentos biológicos diferentes. Esta función depende de que las células se unan entre sí y que su membrana esté polarizada en dos dominios estructural, fisiológica y bioquímicamente diferentes: el apical o luminal orientado hacia el medio externo, y el basolateral dirigido hacia el compartimento intersticial (Cereijido y cols., 1989a y b). El establecimiento de la adhesión intercelular y de estos dos dominios membranales ocurre en múltiples etapas que pueden alterarse y conducir a la transformación celular y metástasis (Gabbert y cols., 1985; Fish y Molitoris, 1994; Kirkpatrick y Peifer, 1995), al desarrollo de procesos inflamatorios (enfermedad de Davidson y de Chron)(Fish y Molitoris, 1994), o a la infección por agentes patógenos (por ejemplo, infección por citomegalovirus en pacientes inmunodeprimidos; Pereira y cols., 1995).

A principios del siglo XX la adhesión intercelular en los epitelios se atribuyó a lo que entonces se denominó barra terminal, que no era sino un engrosamiento de la membrana en el límite de las caras apical y basolateral (Cereijido, 1992) y que se pensaba actuaba como una especie de cemento entre las células vecinas. Ahora sabemos que esta barra terminal está compuesta por varias estructuras (Farquhar y Palade, 1963):

a) La unión estrecha (UE). Se localiza justo en el límite entre las caras apical y basolateral y actúa como una barrera de difusión que regula el paso de iones y moléculas a través de la ruta paracelular (espacio lateral entre célula y célula). También participa en el mantenimiento de la polaridad celular, ya que impide el libre movimiento de los lípidos y de las proteínas a través de la membrana plasmática separando a ésta en los dominios apical y basolateral (Diamond, 1977).

b) La unión adherente (UA). Se encuentra adyacente a la unión estrecha y es responsable de iniciar los contactos célula-célula de manera dependiente de calcio.

c) Los desmosomas. Se localizan por debajo de las uniones adherentes y a lo largo de la membrana lateral. Su función es reforzar por medio de contactos puntuales la adhesión intercelular; por ello, abundan en tejidos que están sometidos a tensión mecánica frecuente.

d) Las uniones comunicantes. Se localizan en la misma región que los desmosomas y su función es el intercambio de moléculas entre células vecinas.

Al conjunto de estas uniones se le denomina complejo de unión intercelular (figura 8-1). Hasta hace poco, estas uniones intercelulares eran vistas sólo como elementos estructurales que mantienen unidas a las células. Sin embargo, son también centros de transducción de señales recibidas del medio ambiente y de células vecinas y responden a diversos agentes fisiológicos, patológicos o experimentales (Schneeberger, 1994).

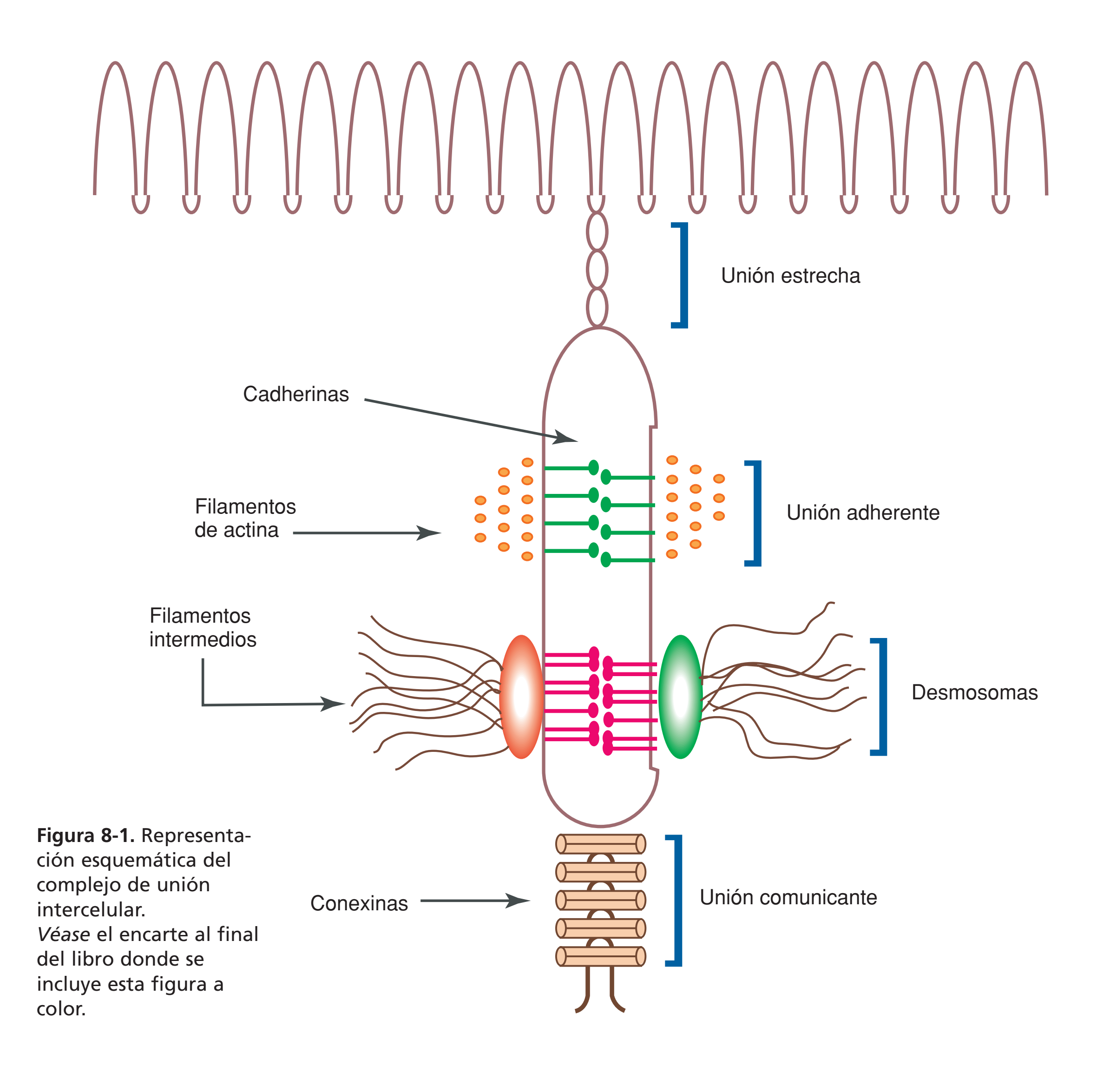


Figura 8-1. Representación esquemática del complejo de unión intercelular. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

En este capítulo describiremos a las uniones estrechas y las adherentes. Primero nos referiremos a las moléculas de la UE, el ensamblado y sellado de la UE y luego al conjunto de proteínas de la UA y la función de las mismas.



La unión estrecha

Descripción morfológica

Mediante microscopia electrónica de transmisión, la UE se ve en un corte transversal como una serie de contactos puntuales de la membrana plasmática, donde las caras externas de las membranas adyacentes convergen y se funden, obliterando el espacio intercelular. Cuando se adiciona un marcador electrodenso no permeable, como el rojo de rutenio o el lantano, se observa que se detienen justamente en los contactos puntuales de la unión estrecha (figura 8-2a).

La unión estrecha es una serie de contactos puntuales de la membrana plasmática, donde las caras externas de las membranas adyacentes convergen y se funden, obliterando el espacio intercelular.

Si se analiza el interior de la membrana plasmática mediante la técnica de criofractura, la UE aparece como una serie de filamentos en la cara protoplásmica y de surcos en la cara exoplásmica, que se entrecruzan formando una red (figura 8-2b) (González-Mariscal y cols., 2001).

Organización molecular de la unión estrecha

A nivel molecular, la constitución de la UE parece seguir el paradigma de organización del resto de las uniones celulares: un dominio extracelular adhesivo representado por proteínas transmembranales, que en su región citoplásmica contactan a un agregado de varias proteínas que constituyen el dominio submembranal. Algunas de estas proteínas son parte de mecanismos de transducción de señales, mientras que otras se unen a diversas proteínas del citoesqueleto (figura 8-3).





Figura 8-2. a) Corte fino de una célula MDCK tratada con rojo de rutenio. La flecha señala a la unión estrecha, obsérvese como en esta región se bloquea el paso del colorante por la ruta paracelular (x 90,000; cortesía de B. Chávez). **b)** Imagen de una réplica de criofractura de la unión estrecha en las células MDCK (x 30,000; cortesía de B. Chávez).

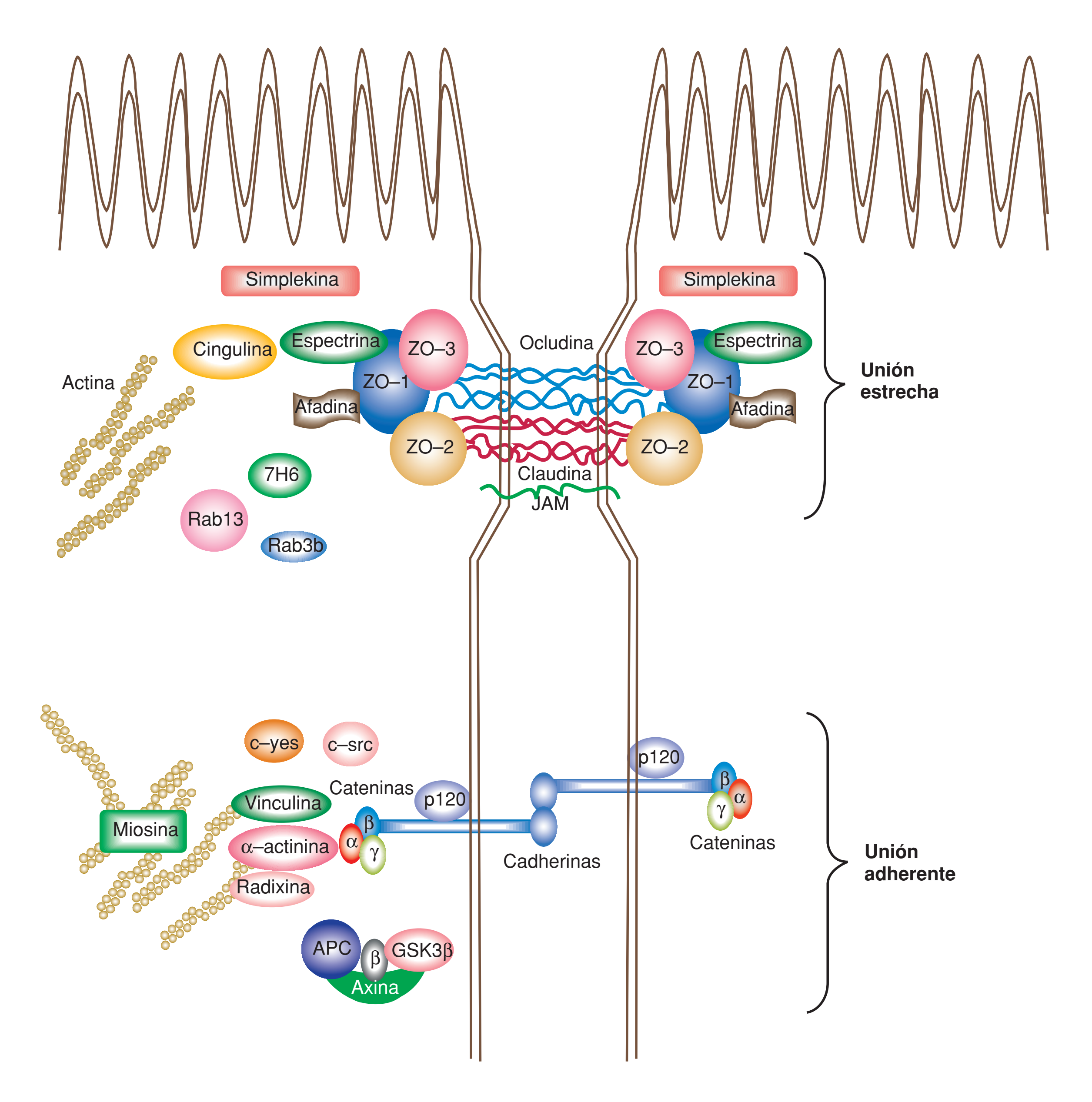


Figura 8-3. Representación esquemática de las proteínas de la unión estrecha y adherente. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

La ocludina

De 65 kDa, fue la primera proteína integral y transmembranal de las UEs que se identificó. Su nombre proviene de la denominación en latín de la UE: *zonula occludens* que significa región que ocluye. Es un constituyente de los filamentos de la UE que se observan en las réplicas de criofractura. El análisis de su secuencia aminoacídica muestra cuatro dominios transmembranales y dos dominios extracelulares; estos últimos integran la región de contacto con la célula vecina (Furuse y cols., 1993). El DNA complementa-

rio (DNAc) de esta proteína no presenta homología con el de ninguna proteína previamente caracterizada. La ocludina parece desempeñar un papel importante en el funcionamiento de las uniones estrechas, ya que: 1) cuando células epiteliales se transfectan con ocludina mutada, ésta se localiza en las uniones estrechas, pero la unión se vuelve permeable al flujo paracelular de iones y moléculas (Balda y cols., 1996a; Chen y cols., 1996); 2) El RNA mensajero de la ocludina se expresa intensamente en epitelios ricos en uniones estrechas y muy débilmente en líneas fibroblásticas (carecen de UE) (Saitou y cols., 1996); 3) en las células endoteliales de cerebro, que tienen una elevada resistencia transepitelial, se expresan altos niveles de ocludina que colocaliza con la proteína ZO-1 en los sitios de contacto célula-célula. En cambio, en las células endoteliales de aorta, que forman UE con muy baja resistencia transepitelial, la ocludina es casi indetectable (Hirase y cols., 1996); y 4) en los túbulos renales de los mamíferos la expresión de ocludina aumenta conforme se incrementa la resistencia eléctrica transepitelial (RET) y la complejidad de la UE. Por tanto, hay más ocludina en los segmentos colectores que en los proximales (González-Mariscal y cols., 2000).

La fosforilación de ocludina se incrementa significativamente durante la formación de las uniones estrechas (Sakakibara y cols., 1996), lo que lleva a especular sobre una posible regulación del funcionamiento de la unión a través de procesos de fosforilación-desfosforilación.

Claudinas

Su nombre proviene del latín *claudere*, que significa cerrar o claudicar, en referencia a la función de la UE de bloquear el paso de moléculas por la ruta paracelular. En 1998 las claudinas 1 y 2 se identificaron como componentes estructurales de las UEs. Estas proteínas integrales de 23 kDa, tienen cuatro dominios transmembranales, no se parecen a la ocludina (Furuse y cols., 1998a) y cuando se introducen a fibroblastos forman redes de filamentos semejantes a las UEs epiteliales (Furuse y cols., 1998b). Las claudinas transfectadas en células epiteliales se incorporan a las UEs preexistentes (Furuse y cols., 1998a). La búsqueda, en bancos de información, de secuencias similares a las claudinas 1 y 2 reveló la existencia de varias secuencias semejantes, que habían sido previamente clonadas, pero que hasta ese momento se desconocía su asociación con las UEs. Las 18 proteínas hasta ahora identificadas como claudinas constituyen una familia, y entre ellas destacan: 1) la claudina 4, inicialmente identificada como el receptor para la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (Katahira y cols., 1997); 2) la claudina 5, descubierta como una proteína truncada en pacientes con síndrome velo-cardio-facial (TMVCF)(Carlson y cols., 1997); 3) la claudina 11 o proteína específica de los oligodendrocitos (OSP), que ahora se sabe se localiza en las UEs de las células de Sertoli y de las cubiertas multilaminares de mielina (Morita y cols., 1999b); y 4) la claudina 16 o paracelina cuyo gen se encontró mutado en pacientes con hipomagnesemia renal hereditaria. A diferencia de otros cationes, tales como el Na^+, K^+ o el Ca^{2+}, la reabsorción de

Mg^{2+} en el riñón ocurre fundamentalmente por la ruta paracelular y se origina por el gradiente electroquímico existente a través del epitelio del asa ascendente gruesa de Henle (TAL), región donde se localiza exclusivamente la claudina 16 (Simon y cols., 1999). En consecuencia, se ha propuesto a esta molécula como un canal selectivo a Mg^{2+}. Esta observación es sumamente importante, ya que la presencia de canales iónicos en la UE está en concordancia con una de las funciones fundamentales de la unión que es regular el flujo de iones y moléculas por la ruta paracelular (Goodenough y Wong, 1999).

La cantidad de claudina que expresa un epitelio parece relacionarse con su nivel de "abrochadura". Así, cuando la claudina 1 se sobreexpresa, la monocapa aumenta su RET y reduce el flujo paracelular de moléculas (Inai y cols., 1999). Sin embargo, la relación entre RET y expresión de claudinas es compleja, ya que cada tejido expresa a un grupo específico de claudinas. Por ejemplo, mientras que el riñón expresa casi todas las claudinas, otros tejidos como el testículo tienen una muy baja expresión de las claudinas 1 a 8 y sus UEs están fundamentalmente constituidas por la claudina 11 (Morita y cols., 1999a).

JAM (junctional associated membrane protein)

Esta proteína se identificó mediante un anticuerpo monoclonal generado contra células endoteliales. Sin embargo, también se expresa en las células epiteliales. JAM posee una sola región transmembranal y su porción extracelular contiene dos dominios con enlaces disulfuro, típicos de las inmunoglobulinas. JAM se localiza en las UEs y, cuando se transfecta disminuye la permeabilidad de las monocapas al flujo paracelular de moléculas. JAM media adhesiones célula-célula homotípicas y los anticuerpos contra esta molécula inhiben la migración transendotelial de los monocitos *in vitro* e *in vivo*. Como JAM se expresa tanto en endotelios como en epitelios, se sospecha que es responsable del paso de los leucocitos por la ruta paracelular de epitelios y endotelios. Las funciones de JAM pueden ser varias y no restringirse exclusivamente a la UE, ya que por un lado ha sido detectada en los megacariocitos que carecen de UE y, por otro, no se expresa en algunas células epiteliales tales como los hepatocitos que contienen UEs bien desarrolladas (*Martin*-Padura y cols., 1998).

Simplekina

Esta proteína de 127 kDa se localiza en la porción citoplásmica de las UEs de los epitelios, pero no de los endotelios. Sin embargo, tanto su mRNA como la proteína pueden detectarse en células que carecen de uniones estrechas (por ejemplo, fibroblastos) e incluso de cualquier tipo de contacto estable (por ejemplo, linfocitos). En todas estas células la simplekina aparece en el núcleo y, sólo en aquellas que forman UE, se recluta parcial, pero específicamente, a la porción citoplásmica de la unión. Estas observaciones hacen

pensar en la posibilidad de que la simplekina sea una proteína del tipo *housekeeping* (que sirven para el mantenimiento básico de toda célula) con localización nuclear y que sólo en ciertos tipos celulares como los epitelios sea reclutada a las placas de la unión estrecha (Keon y cols., 1996).

Cingulina

Su nombre proviene del latín *cingere* que significa rodear o cercar, en referencia a la banda de UE que rodea a las células epiteliales y endoteliales. Esta proteína, que presenta dos isoformas de 108 y 140 kDa, inmunolocaliza específicamente con la placa citoplásmica de la unión estrecha de epitelios y endotelios. Forma dímeros con dominios enrollados (*coiled-coil*) semejantes a los presentes en las cadenas pesadas de la miosina, lo que tal vez explique su identificación inicial empleando un anticuerpo monoclonal generado contra fracciones intestinales enriquecidas de miosina (Citi y cols., 1988). Además de la región enrollada, la cingulina contiene un dominio amino-terminal globular sin homología a ninguna proteína hasta ahora conocida. La cingulina copurifica con la actinomiosina y se asocia a las proteínas corticales de la unión estrecha ZO, lo que sugiere que actúa como puente entre la placa citoplásmica de la UE y el citoesqueleto (Cordenonsi y cols., 1999).

Barmotina/7H6, Rab13 y Rab3B

La barmotina/7H6 (155 o 175 kDa, dependiendo de la especie) ha sido localizada específicamente en la placa citoplásmica de la UE de los epitelios y de los capilares cerebrales endoteliales. Cuando en los epitelios se induce la migración celular con el factor de crecimiento hepático o factor de dispersión, la barmotina deja de expresarse, a diferencia de las proteínas ZO-1 y E-cadherina que aún se presentan en los contactos célula-célula. Estos resultados sugieren que la barmotina es una molécula que se presenta exclusivamente en las UEs maduras (Muto y cols., 2000).

Las proteínas Rab13 y Rab3B pertenecen a la superfamilia *Ras* de pequeñas proteínas G (se activan intercambiando GDP por GTP y se inactivan al hidrolizar el GTP) que están involucradas en la regulación y el direccionamiento del transporte intracelular. Las Rab se localizan en la cara citoplásmica de las vesículas y los organelos involucrados en las vías biosintéticas y endocíticas, donde regulan pasos específicos del transporte vesicular. En las células que carecen de UE la Rab13 se encuentra dispersa en el citoplasma, pero en las células epiteliales se ubica en las UEs (Zahraoui y cols., 1994). El mRNA de Rab13 está presente desde el comienzo del desarrollo embrionario; sin embargo, la proteína se concentra en la membrana en la región de la naciente unión intercelular hasta el momento de la compactación embrionaria. Posteriormente, cuando la unión intercelular inicial se diferencia en UE y adherente, Rab13 se localiza exclusivamente en la primera. Ya que las proteínas Rab regulan el tráfico vesicular, se ha

pensado sobre su papel en el direccionamiento de las proteínas de la UE a su destino. Esta sugerencia se apoya además en el hecho de que la proteína regulatoria de Rab13, la δ-PDE, posee secuencias carboxilo-terminal capaces de interactuar con los dominios PDZ de las proteínas ZO (Sheth y cols., 2000).

La proteína Rab3b está involucrada en los procesos de exocitosis regulada y en las células epiteliales se concentra en la región de la UE (Weber y cols., 1994). Se sabe que su sobreexpresión reorganiza a la actina en largos filopodios y modifica el direccionamiento de ZO-1 a la UE, mediante un proceso en el que participa la enzima fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3-cinasa) (Sunshine y cols., 2000).

Afadina/canoe

Esta proteína es un blanco de *Ras* que posee un dominio PDZ y se asocia con ZO-1 en las UEs de las células epiteliales y en las uniones de cadherina de los fibroblastos (Yamamoto y cols., 1997; Mandai y cols., 1999). La activación por *Ras* de Afadina/canoe inhibe su interacción con ZO-1 (Yamamoto y cols., 1999). Durante la embriogénesis, su presencia es requerida para una correcta cerradura dorsal (Takahashi y cols., 1998) y en el sistema nervioso se localiza en las densidades postsinápticas (Buchert y cols., 1999).

Las proteínas ZO: ZO-1, ZO-2 y ZO-3

El nombre ZO proviene de la abreviatura de *zonula occludens,* el nombre en latín de la UE y la numeración 1, 2 o 3 revela el orden con el que fueron siendo descubiertas estas moléculas (Stevenson y cols., 1986; Gumbiner y cols., 1991; Haskins y cols., 1998):

ZO-1. Esta proteína de 220 kDa se localiza en las UEs de las células epiteliales y endoteliales. Sin embargo, también está presente en el citoplasma y los contactos puntuales de células no epiteliales tales como astrocitos, células de Schwann, fibroblastos, glioma, sarcoma y líneas celulares de mieloma (Howarth y cols., 1992). En las células epiteliales ZO-1 se encuentra asociada a las uniones adherentes cuando la UE aún no se ha establecido, ya sea por un tratamiento experimental como la ausencia de calcio (Rajasekaran y cols., 1996) o en las primeras etapas del desarrollo embrionario (antes de la compactación del embrión formado por 8 células) (Fleming y cols., 1989). En las sinapsis ZO-1 se acumula en la terminal presináptica (Buchert y cols., 1999).

Se han detectado tres dominios de procesamiento alternativo en ZO-1: α, β y γ. El dominio α es una región de 80 aminoácidos presente sólo en UE y no en adherentes y su abundancia se relaciona con una mayor RET del tejido. Esta conclusión se basa en las siguientes observaciones: 1) los epitelios tienen en general una RET mayor que los endotelios y, aunque ambos

presentan las isoformas α^+ y α^-, los primeros expresan una mayor cantidad de ZO-1 α^+, y los segundos de α^- (Willot y cols., 1992); 2) la isoforma α^+ no se detecta en el epitelio del borde en cepillo del glomérulo del mamífero después del nacimiento; este epitelio es un caso particular, ya que en la etapa embrionaria posee UEs típicas, mismas que pierde a partir del nacimiento cuando precisamente comienza la filtración renal que exige un flujo libre de moléculas por la ruta paracelular de los podocitos del glomérulo (Kurihara y cols., 1992); 3) durante el desarrollo embrionario, cuando aún no hay UE, la isoforma α^- se expresa en los contactos intercelulares ricos en cadherina de los blastómeros. En cambio, la isoforma α^+ aparece más tarde cuando se forma el blastocele y se establecen las UEs (Sheth y cols., 1997). Los insertos de las isoformas β_1, β_2 y γ tienen 7, 20 y 45 aminoácidos, respectivamente. Estas isoformas se expresan en muy diversos tejidos, pero su función aún se desconoce (González-Mariscal y cols*.,* 1999a).

La expresión de ZO-1 desempeña un papel fundamental en la fisiología de la UE; así, por ejemplo, se observa que existe más ZO-1 en los segmentos de alta resistencia del riñón (túbulos colectores) que en los de alta permeabilidad (segmentos proximales) (González-Mariscal y cols*.,* 2000). Por otro lado, existen diversos agentes que al modular la expresión de ZO-1 alteran la funcionalidad de la UE. Por ejemplo, los glucocorticoides incrementan la resistencia al flujo transendotelial a través de un aumento en la expresión de ZO-1 (Underwood y cols., 1999) y el interferón gamma aumenta la permabilidad epitelial al disminuir los niveles de ZO-1 (Youakim y cols., 1999). La baja expresión de ZO-1 en los epitelios se relaciona con la progresión tumoral (Hoover y Liao, 1998). Esta situación, aunque ha sido poco explorada, sugiere que la UE y/o sus componentes desempeñan un papel en la regulación del crecimiento celular.

ZO-1 contiene en su secuencia dos señales de direccionamiento nuclear y se localiza en el núcleo de monocapas epiteliales subconfluentes o con contactos célula-célula inmaduros (Gottardi y cols., 1996). La localización nuclear sugiere nuevos roles para esta proteína y la reciente observación de su unión a un factor de transcripción (ZONAB) con el que regula la progresión del ciclo celular (Balda y Matter, 2000) refuerza esta idea.

ZO-2. Esta proteína de 160 kDa está presente en las UEs de las células epiteliales y endoteliales y en las uniones adherentes de las células no epiteliales tales como fibroblastos y células musculares cardiacas (Itoh y cols., 1999). La región carboxilo-terminal de ZO-2 es sumamente variable en diferentes especies y contiene regiones de procesamiento alternativo con función desconocida (Beatch y cols., 1996; Collins y Rizzolo, 1998). En las células pancreáticas se ha descubierto la presencia de 2 transcritos de ZO-2: A y C, que difieren en su extremo 5' por la presencia en la primera isoforma de una secuencia de 23 aminoácidos. Esta isoforma no se expresa en los adenocarcinomas pancreáticos, lo que sugiere un papel importante de estos 23 aminoácidos en la regulación del crecimiento celular (Chlenski y cols., 1999).

ZO-2 contiene en su secuencia señales de importación y exportación nuclear y es capaz de moverse entre el núcleo y la UE de acuerdo al estado de confluencia del epitelio (Islas y cols., 2002).

ZO-3. Esta proteína, de 130 kDa, se identificó por su coprecipitación con ZO-1 (Balda y cols., 1993). Su secuencia contiene dos señales de localización nuclear (González-Mariscal y cols., 1999a).

La familia MAGUK

ZO-1, ZO-2 y ZO-3 son miembros de la familia de proteínas MAGUK; el nombre MAGUK proviene de las iniciales en inglés de *membrane associated guanylate kinases homologues* (Kim, 1995; Anderson y Van Itallie, 1995). Los miembros de esta familia se caracterizan por: 1) localizarse en estructuras de unión celular especializadas, como las densidades sinápticas, la UE y las uniones septadas (el equivalente de las UEs en los insectos); 2) estar constituidas por un conjunto de módulos o dominios, cuyo número y disposición se ha conservado a través de la evolución (Kim, 1995), y 3) reclutar proteínas y transducir señales que modulan el desarrollo embrionario normal y suprimen tumores.

Los dominios de las proteínas MAGUK

En consenso todos los miembros de la familia presentan los siguientes módulos: 1) de uno a tres repetidos de un dominio llamado PDZ (por estar presentes en las proteínas PSD95, disc large y ZO-1); 2) un dominio SH3 (dominio 3 con homología a *Src*), y 3) una región de homología con la enzima guanilato-cinasa (GK) (Kim, 1995; Anderson y Van Itallie, 1995) (figura 8-4).

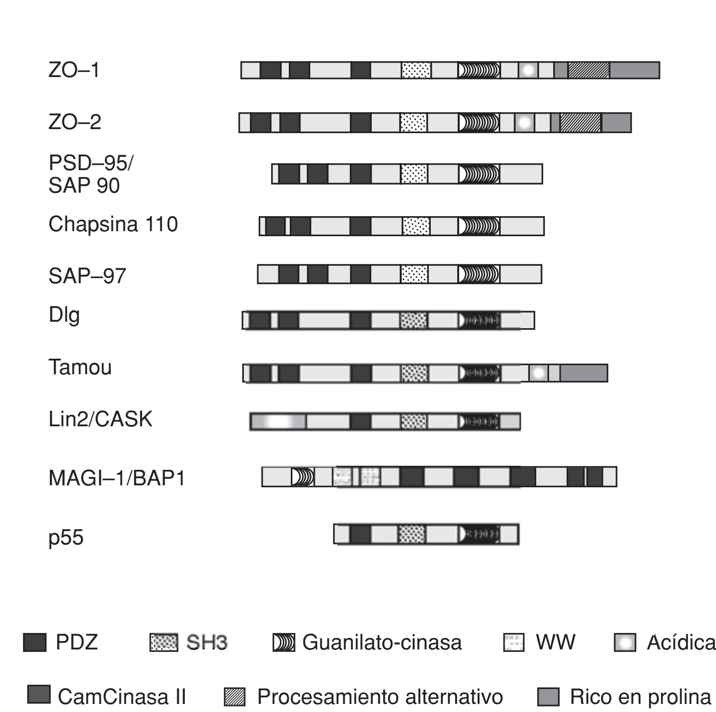


Figura 8-4. Representación esquemática de los diferentes dominios presentes en las proteínas de la familia MAGUK.

a) Los dominios PDZ. Estos dominios son módulos de reconocimiento proteico de aproximadamente 90 aminoácidos (aa) que repiten la secuencia glicina-leucina-glicina-fenilalanina (Morais-Cabral y cols., 1996). Estos dominios pueden unirse de manera heterotípica al extremo carboxilo-terminal de otra proteína con la secuencia consenso treonina/serina-X-valina o con aminoácidos hidrofóbicos en la posición -2 (Kim y cols., 1995; Kornau y cols., 1995; Songyang y cols., 1997). También se unen de manera homotípica con el repetido PDZ de otra proteína (Brenman y cols., 1996). En algunas proteínas los segmentos PDZ-1 y PDZ-2 forman una unidad conformacional que une ATP (Marfatia y cols., 1996) y se asocia a otras proteínas (Lue y cols., 1996). La presencia de serina o treonina en la posición -2 de las moléculas que se asocian a PDZ sugiere regulación de esta interacción proteína-proteína por fosforilación. Tal es el caso del canal rectificador de K^+, Kir 2.3, cuya fosforilación en la serina -2 inhibe su interacción con el PDZ-2 de la MAGUK sináptica PSD-95 (Cohen y cols., 1996).

Los repetidos PDZ tienen un papel crucial en el agrupamiento y anclaje de las proteínas transmembranales a dominios específicos de membrana. Esta función se observa con claridad con los canales de K^+ tipo *shaker* y los receptores a NMDA que sólo se agrupan en presencia de PSD-95 (Kim y cols., 1995 y 1996). Por tanto, ha emergido la visión de considerar a las proteínas con múltiples dominios PDZ como “andamios” corticales que asocian en regiones específicas de la membrana a diferentes proteínas que participan en una misma cascada de señalización.

En el caso de las proteínas MAGUK de la UE, ZO-1 interactúa con ZO-2 y ZO-3 a través del segundo repetido PDZ de cada una, mientras que ZO-2 y ZO-3 no se asocian entre sí (Wittchen y cols., 1999). El extremo carboxiloterminal de las claudinas interactúa con el primer repetido PDZ de las ZO. Por tanto, las proteínas ZO emplean sus dominios PDZ para interactuar homotípicamente entre sí y heterotípicamente con algunas de las proteínas transmembranales de la UE.

b) Las regiones SH3. El nombre SH3 proviene de las siglas en inglés de regiones homólogas a la porción no catalítica de la tirosina-cinasa del sarcoma de Rous. Estas regiones son también dominios de unión a proteína y se han descrito en muchas proteínas que participan en el señalamiento de las tirosina-cinasas, como las que controlan a *Ras* (por ejemplo, GRB2) y en componentes del citoesqueleto como miosina y espectrina. El dominio SH3 se une a regiones de 10 aa ricas en prolina que presentan el consenso prolina-X-X-prolina (Pawson, 1995). En el caso de ZO-1, la región SH3 se asocia con una serina-cinasa que fosforila aminoácidos adyacentes al extremo carboxilo del dominio SH3 (Balda y cols., 1996b).

c) Región de homología a guanilato-cinasa (GK). Este módulo es homólogo a la enzima GK, la cual cataliza la conversión de GMP a GDP a expensas del ATP. La función de este dominio en las proteínas MAGUK es enigmática, ya que en varias proteínas de esta familia, incluidas las ZO, el módulo GK carece de los sitios de unión a ATP y/o GMP. En las MAGUK sinápticas, este módulo media diversas interacciones proteína-proteína

(Kim y cols., 1997; Deguchi y cols., 1998; Yamada y cols., 1999) y en el caso de las ZO es responsable de la interacción con la ocludina (Fanning y cols., 1998).

d) Dominios ricos en prolina, de procesamiento alternativo y semejantes a la proteína-cinasa Ca^{2+} calmodulina-dependiente. Algunos miembros de la familia MAGUK tienen además otros dominios, por ejemplo, LIN2/CASK[1] tiene una región similar a la proteína-cinasa II dependiente de Ca^{+2}-Calmodulina (Hoskins, 1996). En el caso de ZO-1 y ZO-2 después del dominio GK se pueden distinguir varios dominios o secuencias características: un dominio acídico, una región con siete repetidos de leucina, común en las proteínas que se dimerizan mediante una cremallera de leucinas, y un extremo carboxilo-terminal rico en prolina (Jesaitis y Goodenough, 1994). En este último dominio, ZO-1 y ZO-2 presentan 17 y 2 secuencias PXXP, respectivamente, que podrían funcionar como sitios de reconocimiento de SH3. En esta misma región, Tamou, una proteína MAGUK presente en las uniones septadas de los insectos (equivalente a la UE de los vertebrados) presenta 15 motivos PXXP (González-Mariscal y cols., 1999), lo que indica que se trata de una característica muy conservada a lo largo de la evolución. A diferencia de ZO-1 y -2, el extremo carboxilo-terminal de ZO-3 no es rico en prolina; en cambio, en la región que une a los repetidos PDZ1 y 2 el 14% de los aminoácidos son prolinas (Stevenson y cols., 1996).

La rama sináptica de la familia MAGUK tiene tres sitios de procesamiento alternativo (I1-3). De ellos, el sitio I3 funciona como dominio de asociación a la 4.1, una proteína asociada a la actina (Marfatia y cols., 1996).

Otros miembros de la familia MAGUK

a) **PSD95/SAP90.** Esta proteína deriva su nombre de las siglas en inglés de densidades post-sinápticas, la región donde fue encontrada inicialmente. Por su extremo carboxilo se une a la proteína 4.1 y mediante sus dominios PDZ recluta canales de K^+ tipo *shaker* (Kv 1.4), a rectificadores entrantes (Kir 2.1 y 2.3), a los receptores a N-metil-D-asparagina (NMDA), a los receptores de kainato GluR6 y Ka2 y a la enzima nNOS en las densidades sinápticas (figura 8-5) (Kim y cols., 1995; Kornau y cols., 1995; Brenman y cols., 1996; Garcia y cols., 1998).

b) **Chapsina110.** Esta proteína tiene 70% de identidad con PSD95. En cerebro de rata muestra un patrón de expresión somatodendrítico que colocaliza con la distribución de PSD95. Se asocia con las densidades postsinápticas en el cerebro y media el agrupamiento de los

[1] La notación de dos nombres para una misma proteína, separados por una barra, se debe a que habían sido descritas independientemente, en distintos oganismos, antes de que su secuenciación demostrara que se trataba de una proteína homóloga.

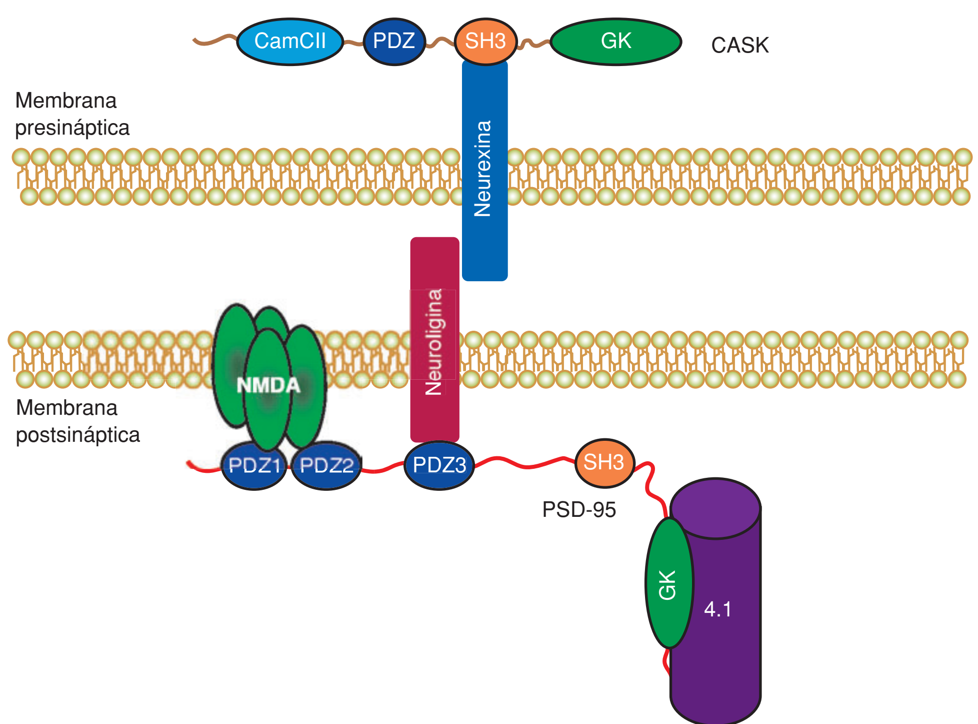


Figura 8-5. Las MAGUKs PSD-95 y CASK se localizan en las sinapsis y se asocian a canales y proteínas transmembranales. CASK se localiza en la región submembranal presináptica donde se asocia con la neurexina. Esta se une de forma heterofílica a la neuroligina de la membrana postsináptica. En la región submembranal de la membrana postsináptica se encuentra la PSD-95 que a través de sus repetidos PDZ une tanto al receptor a NMDA como a la neuroligina. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

receptores a NMDA y de canales de K^+ tipo *shaker*. La chapsina110 y la proteína PSD95 pueden hetero-multimerizarse entre sí. El RNA mensajero de la chapsina no se detecta en corazón, músculo esquelético, hígado, riñón, pulmón o bazo y sólo una señal muy leve se detecta en las glándulas adrenales. Por lo tanto, se piensa que es exclusiva de las uniones sinápticas (Kim y cols., 1996).

c) **SAP97.** Presenta 80% de homología con chapsina110 y se localiza en terminales pre-sinápticas excitatorias y en axones no mielinizados de cerebro. En las células epiteliales colocaliza con la E-cadherina en las uniones adherentes (Muller y cols., 1995; Ide y cols., 1999).

d) **Disc-large (dlg).** Esta proteína se localiza en las uniones septadas de las células epiteliales de los invertebrados, en las uniones neuromusculares y en la membrana de los eritrocitos. Mutaciones en el gen *dlg* producen defectos en las estructuras postsinápticas y tumores letales en los epitelios (Woods y cols., 1991; Bryant y cols., 1993; Lahey y cols., 1994). La pérdida de *dlg* resulta en ausencia de uniones septadas, abolición de la polaridad epitelial y crecimiento neoplásico. Estos mismos efectos se observan con mutaciones en los genes larva letal gigante (*lgl*) y garabato (*scribble*). Las proteínas lgl

y *scribble* no pertenecen a la familia MAGUK, pero ambas contienen repetidos PDZ y colocalizan con *dlg* en la unión septada. Lo anterior sugiere la participación de las 3 proteínas en una ruta de señalización común que regula la polaridad celular y el crecimiento (Bilder y cols., 2000).

En las sinapsis *dlg* se une por medio de sus repetidos PDZ a los canales de K^+ tipo *shaker* (Kim y cols., 1995). *Dlg* se une a la proteína 4.1 (Lue y cols., 1994) y está ausente de la membrana eritrocítica de los pacientes con anemia hemolítica y eliptocitosis hereditaria cuyos glóbulos rojos carecen de 4.1 (Baumgartner y cols., 1996).

e) **Tamou.** Es otra MAGUK descrita en *Drosophila* (Takahisa y cols., 1996). La pérdida de su expresión conduce a la aparición de órganos mecano-sensoriales multi-numerarios en *Drosophila*. El análisis de su secuencia junto con la inmunolocalización y el rescate del fenotipo normal por ZO-1, sugieren que la proteína Tamou dio origen al ancestro de las ZO. Tamou participa en una ruta de señalización que une a la membrana celular con la activación de la transcripción del gen *emc*, el cual es un supresor de la actividad proneural.

f) **Lin2/CASK.** Esta proteína participa en la ruta de señalización que conduce a la diferenciación de las células precursoras de la vulva en el nemátodo *Caenorhabditis elegans.* Esta vía se enciende cuando el factor de crecimiento epidermal (EGF) se une a su receptor (EGF-R) y éste, a través de diversos segundos mensajeros, activa a la proteína *Ras*. En *Caenorhabditis elegans* el receptor homólogo al EGF-R, denominado Let 23, presenta una distribución polarizada en las células precursoras de la vulva. En cambio, cuando Lin2 está ausente se produce una distribución no polarizada del receptor, lo que impide su eficiente activación por el EGF y en consecuencia se bloquea la diferenciación de la vulva. Se piensa que Lin2 ancla al receptor Let 23 a sitios específicos de la membrana celular y de esta manera maximiza su sensibilidad hacia las señales externas que inducen la diferenciación celular (Kim, 1995; Hoskins y cols., 1996; Simske y cols., 1996).

El homólogo en mamíferos de Lin2 se denomina CASK y su nombre se forma de las siglas en inglés de "calcio/calmodulina-dependiente serina proteína (k)inasa". En las UEs se asocia por medio de su repetido PDZ con el extremo carboxilo-terminal de la JAM (Martínez-Estrada y cols., 2001). En las neuronas, CASK se localiza en la membrana presináptica donde se asocia con una proteína transmembranal denominada neurexina (Hata y cols., 1996). Esta última se une de manera heterofílica a la neuroligina de la membrana postsináptica que a su vez se asocia submembranalmente con la PDS-95 (figura 8-5)(Irie y cols., 1997; Rao y cols., 2000). La neurexina funciona también como receptor de las neuroxifilinas y la latrotoxina, un componente del veneno de la araña viuda negra, que induce una exocitosis masiva (Sugita y cols., 1999). CASK también se transloca al núcleo, donde se une al fac-

tor de transcripción Tbr-1 que regula la expresión de genes neurales (Hsue y cols., 2000).

En *Drosophila* la neurexina se localiza en las uniones septadas donde colocaliza con las proteínas 4.1 y *dlg*. Las mutaciones en la molécula de neurexina bloquean la formación de las uniones septadas y alteran el funcionamiento de la barrera hemato-nerviosa de la *Drosophila* (Baumgartner y cols., 1996).

g) **MAGI-1/BAP1.** El nombre de MAGI significa MAGUK invertida, porque tiene al dominio GK en el extremo amino y no en el carboxilo. Contiene 5 repetidos PDZ y, en lugar de regiones SH3 que se unen al consenso PXXP, contiene dos dominios WW que se asocian al motivo PXXY. MAGI se expresa en 3 isoformas, dos de ellas contienen señales de localización nuclear y se encuentran predominantemente en el núcleo. La otra, que carece de estas señales, colocaliza con ZO-1 en las UEs (Dobrosotskaya y cols., 1997; Ide y cols., 1999).

h) **P55.** Ésta es una fosfoproteína palmitolada presente en la membrana de los eritrocitos humanos, que sirve de puente entre la proteína transmembranal glicoforina C y la proteína 4.1. La p55 no se presenta en los eritrocitos de pacientes con defectos genéticos en la proteína 4.1 o en la glicoforina C (Marfatia y cols., 1994).

En resumen: las proteínas MAGUK forman parte de complejos en los que actúan como transductoras de señales y como puentes entre una proteína transmembranal (ocludina, un canal de potasio, el receptor a NMDA, glicoforina C o neurexina) y una proteína asociada al citoesqueleto (4.1)(figura 8-6). Por esta característica se les denomina proteínas "andamio". Su función como supresoras tumorales es debida tanto a su papel en los contactos intercelulares como a la asociación de algunas MAGUK con factores de transcripción en el núcleo.

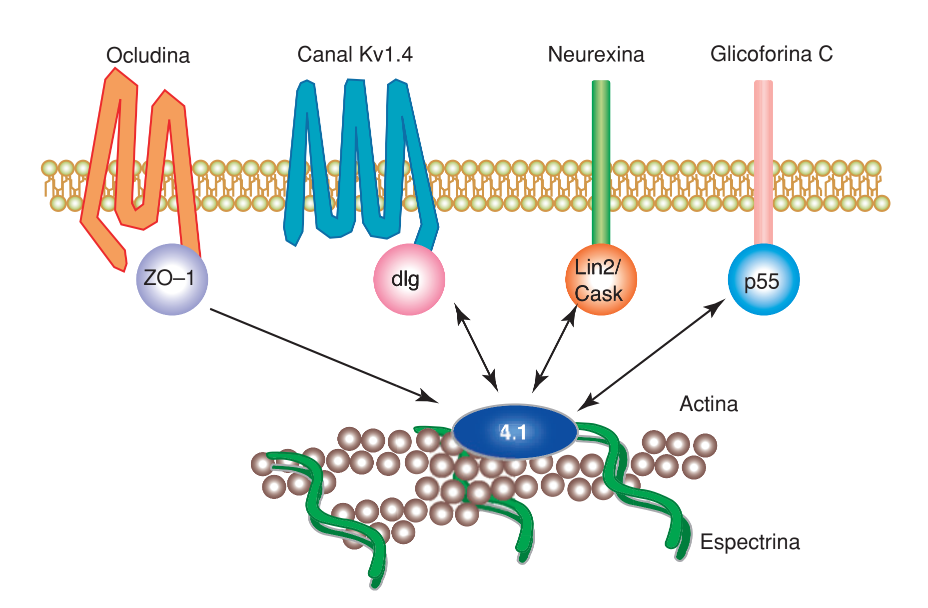


Figura 8-6. Modelo de la asociación existente entre diferentes proteínas transmembranales, las proteínas MAGUK y el citoesqueleto.
Véase el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

Ensamble y sellado de la UE

Las células epiteliales que conservan *in vitro* las características fundamentales de los epitelios son utilizadas como modelo para estudiar el ensamble y el sellado del complejo de unión intercelular. Cuando se cultivan en un medio con baja concentración de calcio (BC, 1-5 μM) no establecen contactos intercelulares, pero al transferirlas ("cambio-a-calcio", CC) a un medio con una concentración normal de calcio (CN, 1.8 mM) desarrollan rápidamente el complejo de unión, y otras características de los epitelios polarizados (Cereijido y cols., 1978; González-Mariscal y cols., 1985; Contreras y cols., 1992). El grado de sellado de la unión estrecha puede monitorearse por la determinación de la resistencia eléctrica transepitelial (RET; figura 8-7), mientras que la formación de filamentos de UE en la membrana puede visualizarse en réplicas de criofractura (González-Mariscal y cols., 1985). Mediante técnicas inmunofluorescentes e inmunocitoquímicas también es posible detectar la aparición en la membrana de los componentes moleculares de la UE. Utilizando esta diversidad de metodologías se logró determinar que el ensamble de las UEs es precedido por la formación secuencial de las UAs y de los desmosomas (González-Mariscal y cols., 1985; Gumbiner, 1988).

Al utilizar durante el CC bloqueadores de la síntesis de proteínas (cicloheximida), del tránsito a través del complejo de Golgi (monensina), del tránsito vesicular (cloroquina) y de la polimerización de actina (citocalasina B), se encontró que después de 20 horas sin calcio los componentes de las UEs ya están sintetizados y se almacenan en un compartimento vesicular posterior al complejo de Golgi (tabla 8-1). Se observó también que dichos componentes se incorporan a la membrana plasmática por medio de un proceso de fusión exocítica (tabla 8-2) en el que participan los microfilamentos de actina (González-Mariscal y cols., 1985).

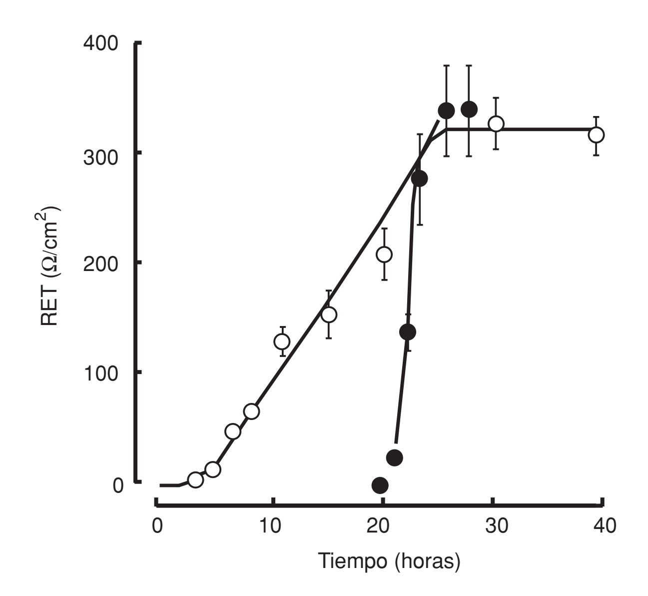


Figura 8-7. La formación de las uniones estrechas depende de la presencia de Ca^{2+}. Las células MDCK se siembran a confluencia sobre un soporte permeable y establecen sus uniones estrechas. En consecuencia la resistencia eléctrica transepitelial (RET) se desarrolla (círculos vacíos). En ausencia de Ca^{2+} las uniones no se forman. Cuando a las 20 horas se añade Ca^{2+}, se produce una cascada de reacciones intracelulares que conduce al establecimiento de las uniones estrechas y el desarrollo de la RET (círculos llenos). (Tomada con permiso de González-Mariscal y cols., 1985.)

Tabla 8.1 Desarrollo de la resistencia eléctrica transepitelial de monocapas de células MDCK transferidas a un medio con calcio en ausencia y presencia de distintas drogas.

Condiciones después del sembrado	Resistencia eléctrica 20 hrs. (Ω/cm^2)	Condiciones durante la segunda incubación	Resistencia eléctrica 24-26 hrs. (Ω/cm^2)
CDMEM	346 ± 51 (7)	CDMEM	331 ± 38 (20)
DMEM	275 ± 13 (8)	DMEM	238 ± 15 (10)
MEM sin Ca^{2+}	2.5 ± 0.5 (49)	CDMEM	289 ± 18 (66)
		DMEM	359 ± 28 (9)
		15 min. CDMEM → 4.45 hr.	
		MEM sin Ca^{2+}	66 ± 31 (6)
		CDMEM + Cicloheximida	329 ± 18 (12)
		CDMEM + Tunicamicina	334 ± 48 (14)
		CDMEM + Monensina	252 ± 58 (10)
		CDMEM + Citocalacina B	4 ± 1 (8)
		CDMEM + Colchicina	250 ± 35 (15)
CDMEM + Tunicamicina			365 ± 72 (5)
CDMEM + Monensina			194 ± 54 (5)

Primera columna: condiciones de incubación a partir de la primera hora de sembradas las células hasta la hora 20. *Segunda columna:* resistencia eléctrica transepitelial a las 20 hrs. *Tercera columna:* condiciones de incubación a partir de la hora 20 hasta las 24-26 hrs. *Cuarta columna:* resistencia a las 24-26 hrs. *Primer renglón:* después de 20 hrs. de cultivo en medio con calcio y suero, las monocapas desarrollan su resistencia y el cambio por medio fresco no la modifica. *Segundo renglón:* en ausencia de suero la resistencia es menor. *Tercer renglón:* en medio libre de calcio la resistencia no se desarrolla, pero al adicionar a la hora 20, medio con calcio (CDMEM), las uniones estrechas se sellan. *Cuarto renglón:* aun si el medio al que se transfieren las monocapas carece de suero la resistencia se desarrolla. *Quinto renglón:* un pulso de calcio de 15 min. no es suficiente para desarrollar eficientemente la resistencia. *Renglones 6-10:* efecto de drogas que bloquean la síntesis de proteínas (cicloheximida), la glicosilación (tunicamicina), el tránsito a través del Golgi (monensina), la polimerización de actina (citocalacina B) y de tubulina (colchicina). *Renglón 11:* la tunicamicina presente durante todo el experimento no altera la resistencia. *Renglón 12:* la presencia continua y prolongada de monensina disminuye el grado de sellado de las uniones.
DMEM = medio basal de Eagle modificado por Dulbecco. CDMEM = DMEM con 10% de suero fetal bovino. Cicloheximida = 6 μg/ml; tunicamicina 1 μg/ml; monensina 10^{-6} M; colchicina = 2×10^{-5} M; citocalasina B = 5 μg/ml. Los valores reportados son medias ± error estándard.

Tabla 8.2 Efecto del calcio y la cloroquina sobre la superficie de membrana y la resistencia eléctrica transepitelial.

Condiciones de cultivo	Superficie de membrana (mm^2)	n	Resistencia eléctrica transepitelial (Ω/cm^2)	n
20 h sin Ca^{2+}	1670 ± 140	11	2.5 ± 0.5	49
20 h sin $Ca^{2+} \rightarrow$ 4 h Ca^{2+}	2530 ± 300	8	289 ± 18	66
20 h sin $Ca^{2+} \rightarrow$ 4 h Ca^{2+} +	1790 ± 100	6	31 ± 10	13
cloroquina (25 mM)				

Los primeros valores reportados son medidas ± error estándar; n, es el número de observaciones.

Participación del calcio extracelular en el ensamblado de las UEs

La actividad de calcio en los epitelios cultivados sin este catión es de 20 nM. Al transferir a estas monocapas a un medio con calcio normal, la actividad sube a 120 nM (figura 8-8). Esta transferencia permite que las

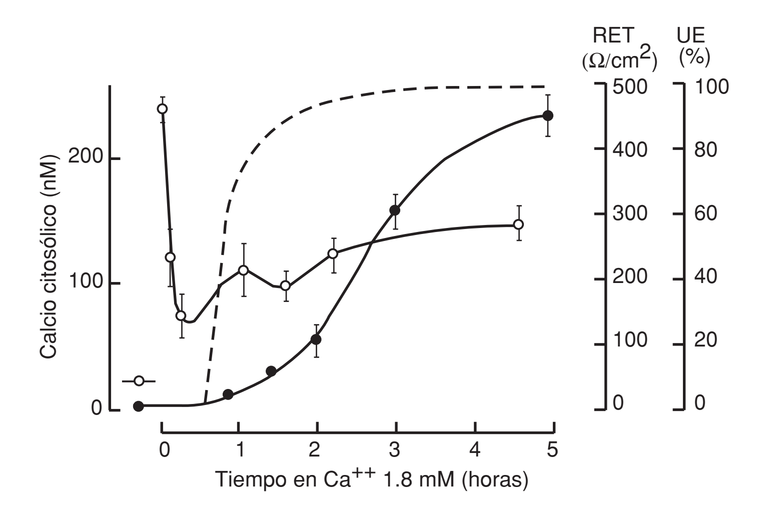


Figura 8-8. Las monocapas de células MDCK cultivadas durante 20 hrs. en un medio libre de Ca^{2+} tienen una muy baja actividad de este ion en su citoplasma (círculos vacíos), no establecen uniones estrechas (línea discontinua), ni desarrollan RET (círculos llenos). Cuando las monocapas se transfieren a un medio con 1.8 mM de Ca^{2+} (tiempo cero) se produce un pronunciado incremento del Ca^{2+} intracelular, que después baja y alcanza un valor estable alrededor de los 120 nM. (Tomada con permiso de González-Mariscal y cols., 1990.)

monocapas desarrollen una RET. Sin embargo, este aumento en el calcio citosólico no es crucial para el ensamble y sellado de las UEs, ya que éstas pueden ensamblarse en presencia de calcio externo, aun cuando se impide con lantano la entrada de calcio a la célula (figura 8-9) (González-Mariscal y cols., 1990).

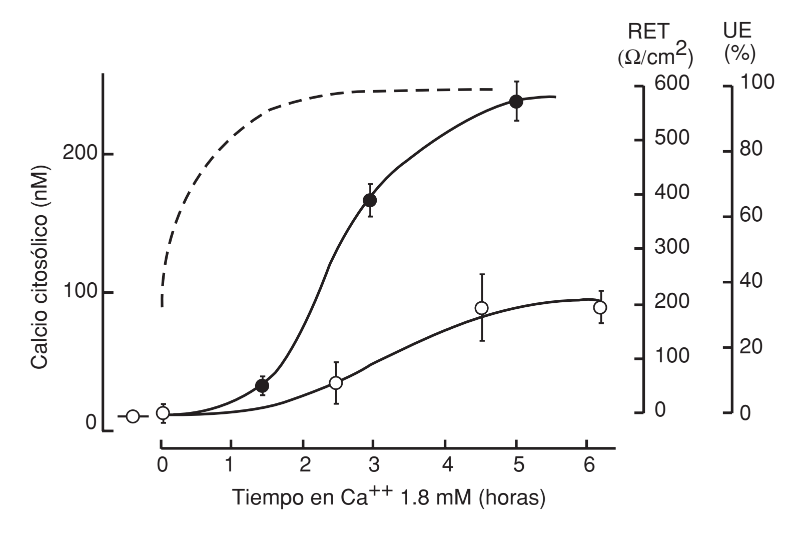


Figura 8-9. Efecto del bloqueo de la entrada de calcio al interior celular al utilizar 1.0 mM La^{3+}, sobre la actividad del Ca^{2+} citosólico, la RET y el porcentaje de uniones cerradas durante un cambio a calcio. La simbología es la misma que la de la figura 8-8. (Tomada con permiso de González-Mariscal y cols., 1990.)

Participación de la proteína G, la fosfolipasa C y la proteína-cinasa C en el ensamble y sellado de las UEs

Durante el proceso de ensamble de las UEs el calcio actúa desde el medio extracelular a través de las moléculas de adhesión dependientes de calcio (cadherinas) que describiremos más adelante. Esta señal de contacto intercelular se transduce y desencadena la activación secuencial de una proteína G inhibitoria sensible a la toxina *pertussis*, la fosfolipasa C y las proteínas cinasas C (PKC) sensible a diacilglicerol (clásicas y nuevas) (figura 8-10). Paralelamente se activa la calmodulina, se rearregla el citoesqueleto de actina y se insertan en la membrana los componentes de la UE almacenados en los compartimentos vesiculares (Balda y cols., 1991 y 1993).

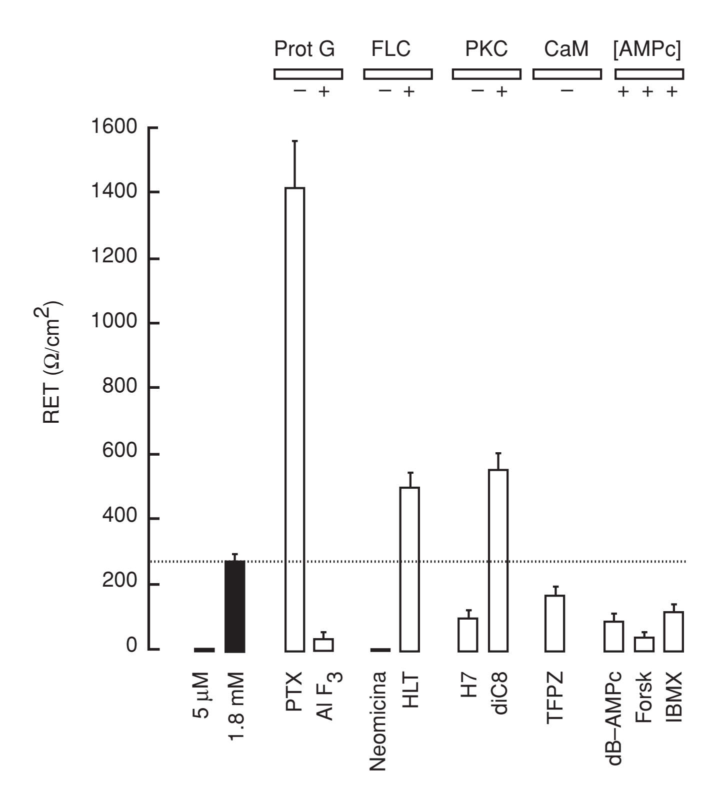


Figura 8-10. Efecto de distintas drogas sobre el desarrollo de la RET, durante un cambio a calcio. La primera y segunda columnas representan los valores control antes y después de 5 hrs. de transferencia a calcio respectivamente. Para facilitar las comparaciones, el nivel de RET control adquirido con la transferencia a calcio se marca con una línea discontinua. En la parte inferior se indican los inhibidores y estimuladores empleados y en la porción superior las moléculas sobre las cuales actúan. Prot G (proteína G): efecto de 14 ng/ml toxina pertussis y de 2 mM AlF_3; FLC (fosfolipasa C): efecto de 110 µM de sulfato de neomicina y 2 µM de hormona liberadora de tirotropina (HLT); PKC (proteína cinasa C): efecto de 50 µM 1-(5-isoquinolinil-sulfonil)-2-metilpiperazina dihidrocloruro (H7) y 100 µg/ml de 1,2-dioctanoilglicerol (diC8); CaM (calmodulina): efecto de 25 µM dihidrocloruro de trifluoperazina (TFPZ); [AMPc]: efecto del dibutiril-AMPc (dB-AMPc), forskolina, e isobutil-metil-xantina (IBMX). (Tomada con permiso de Balda y cols., 1991.)

La participación de la PKC en este proceso es posterior al requerimiento de calcio en el medio externo, ya que la estimulación de las PKC en monocapas cultivadas sin calcio induce la translocación de la PKC (Lehel y cols., 1996) y de la proteína ZO-1 de la región perinuclear a la membrana plasmática, aparecen los filamentos de la unión oclusora en réplicas de criofractura y la célula se rodea de un cinturón de actina (Balda y cols., 1993; González-Mariscal y cols., 1994; Denisenko y cols., 1994). Es importante destacar que la estimulación de la PKC no induce la aparición de la cadherina de la unión adherente en los bordes celulares (Balda y cols., 1993; Denisenko y cols., 1994). Las proteínas asociadas a la unión estrecha ZO-1, ZO-2, ZO-3 y cingulina son fosfoproteínas; sin embargo, no parecen ser el sustrato de fosforilación de la PKC durante el CC, ya que durante este proceso no modifican su estado de fosforilación (Balda y cols., 1993; Citi y Denisenko, 1995). En cambio, durante el desensamble de la unión estrecha inducido por el retiro del calcio, ZO-2 se fosforila en sus residuos de serina por acción de las PKC atípicas y la PKA (Ávila Flores y cols., 2001). En concordancia, se ha observado que la inhibición de la PKC durante el tratamiento con quelantes de calcio previene el desensamble de la UE (Citi, 1992).

La fosforilación en tirosina de las proteínas ZO debilita a la UE. Así, cuando las células se transfectan con Src, o se tratan con el factor de crecimiento endotelial vascular o con inhibidores de fosfatasas de tirosinas, la permeabilidad paracelular se incrementa (Takeda y Tsukita, 1995; Collares-Buzato y cols., 1998; Antonetti y cols., 1999).

El citoesqueleto de actina y su relación con las UEs

Las uniones estrechas están anatómica y funcionalmente asociadas al citoesqueleto.

Las UEs están anatómica y funcionalmente asociadas al citoesqueleto. Por análisis de cosedimentación y transfecciones se ha demostrado interacción directa entre el extremo carboxilo-terminal de las proteínas ZO y la F-actina (Itoh y cols., 1997 y 1999; Fanning y cols., 1998; Wittchen y cols., 1999). Se ha propuesto la hipótesis sobre el papel de las proteínas ZO como puentes entre el citoesqueleto de actina y las proteínas transmembranales de la UE. Éste parece ser el caso con las claudinas, como se mencionó anteriormente, pero no para la ocludina, ya que esta última interacciona directamente con la actina a través de su extremo carboxilo-terminal (Wittchen y cols., 1999).

También existe interacción entre las proteínas ZO y otras proteínas del citoesqueleto. Por ejemplo, ZO-1 y ZO-2 pero no ZO-3, interactúan específicamente por su extremo carboxilo-terminal con la proteína 4.1 (Mattagajasingh y cols., 2000). En las MAGUKs sinápticas, esta interacción se realiza a través de un dominio específico ausente en las proteínas ZO (Lue y cols., 1994). En los ensayos de coinmunoprecipitación se ha observado que ZO-1 forma complejos con la fodrina (Itoh y cols., 1991) y que estos complejos se incrementan cuando las células se depletan de ATP (Tsukamoto y Nigam, 1997). Los dominios PXXP de la región rica en prolina de ZO-1 interactúan con las regiones SH3 de cortactina, una molécula con actividad entrecruzadora de actina (Katsube y cols., 1998).

Los microfilamentos de actina participan de manera importante en el ensamble y el control de la permeabilidad de las UEs, tanto en condiciones fisiológicas como experimentales (Madara y cols., 1986; Madara y Papenheimer, 1987). Por ejemplo, al inhibir la polimerización de la actina con citocalasina B se bloquea la formación de las UEs tanto durante el CC como en monocapas recién sembradas en CN (Meza y cols., 1982; González-Mariscal y cols., 1985). Además, muchos tratamientos que alteran la permeabilidad de la UE también causan cambios en la estructura de los microfilamentos de actina (Madara, 1987; Madara y Papenheimer, 1987).

La actina no presenta cambios significativos en su fosforilación durante el CC. En cambio, la vinculina, una proteína que se asocia a la actina y la une a la membrana, sí parece ser sustrato de la PKC durante el CC, ya que durante este proceso incrementa su fosforilación en serina y treonina. Concordantemente, la inhibición de la cinasa C durante este proceso impide la movilización de la vinculina de la región perinuclear a los bordes intercelulares. Estos resultados sugieren que el papel de la PKC sobre el sellado de las UEs puede ser a través de proteínas del citoesqueleto diferentes a actina (Pérez-Moreno y cols., 1998).

La unión adherente

El establecimiento de contactos intercelulares en los tejidos se inicia con la formación de las uniones adherentes. A diferencia de lo que ocurre con el resto de los componentes del complejo de unión intercelular, las uniones adherentes no pueden distinguirse en un corte fino o una criofractura como una estructura morfológica característica presente en la membrana plasmática lateral.

Al igual que las uniones estrechas, las uniones adherentes están compuestas por complejos multiproteicos en los que participa una proteína transmembranal, la cadherina, unida a proteínas citoplásmicas, las cateninas, y a través de ellas el citoesqueleto de actina (figura 8-3).

Las uniones adherentes están compuestas por complejos multiproteicos.

En esta segunda parte del capítulo vamos a describir las proteínas que forman los conglomerados proteicos de las uniones adherentes, su función y posibles mecanismos de regulación.

Las cadherinas

Las cadherinas constituyen una familia de glicoproteínas dependientes de calcio, que median la adhesión célula-célula en prácticamente todos los tejidos sólidos de los organismos multicelulares.

Las moléculas de adhesión se dividen en cuatro grandes grupos: integrinas, inmunoglobulinas, selectinas y cadherinas. En las uniones adherentes se localizan las cadherinas, las cuales constituyen una familia de glicoproteínas dependientes de calcio que median la adhesión célula-célula en prácticamente todos los tejidos sólidos de los organismos multicelulares. Las cadherinas confieren una adhesión dependiente de calcio, mediante la interacción homofílica con moléculas de cadherina en las células adyacentes.

Todas las cadherinas tienen un dominio extracelular que consiste en repetidos múltiples de un motivo cadherina específico, de aproximadamente 110 aminoácidos, y contienen además varias secuencias cortas de aminoácidos muy conservados. El número de repetidos del motivo de cadherina varía de cuatro a más de treinta. En contraste con los dominios extracelulares, los dominios citoplásmicos de esta superfamilia son muy variables.

La superfamilia cadherina se puede dividir en cuatro grupos: 1) cadherinas clásicas tipo I (E-, N-, P- y R-cadherina) y II (cadherinas 6 a 12); 2) desmosomales (desmocolinas y desmogleínas); 3) cadherinas con un dominio citoplásmico muy pequeño o sin él (L1, T-cadherina), y 4) protocadherinas y otras proteínas menos relacionadas a las cadherinas como el supresor tumoral *fat* de la *Drosophila,* el gen *dachsous* y el proto-oncogen *ret*.

En este capítulo vamos a estudiar únicamente a las cadherinas clásicas E, N y P, porque se localizan en las uniones adherentes y regulan la adquisición del fenotipo epitelial. Derivan su nombre de la inicial del tejido en el que fueron descritas, por ejemplo, epitelial, neural y placentario, respectivamente.

Estructura de las cadherinas clásicas

En esta familia las cadherinas se sintetizan como polipéptidos precursores que necesitan de un procesamiento proteolítico intracelular para activar sus propiedades adhesivas. La región extracelular se localiza hacia el lado amino y la citoplasmática hacia el carboxilo-terminal, conectados mediante un solo segmento transmembranal. El dominio extracelular consta de 5 repetidos de cadherina arreglados en tándem. Cada repetido tiene características propias así como propiedades comunes con los demás. El primer repetido a partir del extremo amino-terminal contiene el dominio de adhesión cadherina específico. Los cinco repetidos de cadherina forman cuatro sitios de unión a calcio, cada uno entre dos repetidos sucesivos (figura 8-11). La unión del calcio con las cadherinas es crucial ya que les permite el correcto plegado, les brinda la rigidez estructural necesaria para su funcionamiento *in vivo* y las vuelve resistentes a las proteasas extracelulares.

Todas las cadherinas clásicas poseen un dominio citoplásmico muy conservado de aproximadamente 150 aminoácidos.

Todas las cadherinas clásicas poseen un dominio citoplásmico muy conservado de aproximadamente 150 aminoácidos, que, como más adelante se verá, funciona como sitio de unión a cateninas, proteínas citoplásmicas que anclan a las cadherinas con el citoesqueleto.

Ya se conoce la estructura tridimensional de algunos repetidos de cadherina. Ellos están compuestos por 7 hebras β antiparalelas que forman una estructura semejante a un barril. Esta estructura es similar a la de las inmunoglobulinas, lo que hace pensar en la posibilidad de que estas dos superfamilias de moléculas de adhesión calcio-dependientes e independientes, respectivamente, deriven de un ancestro común (Overduin y cols., 1995). Las homologías en la secuencia primaria de los cinco repetidos de cadherina

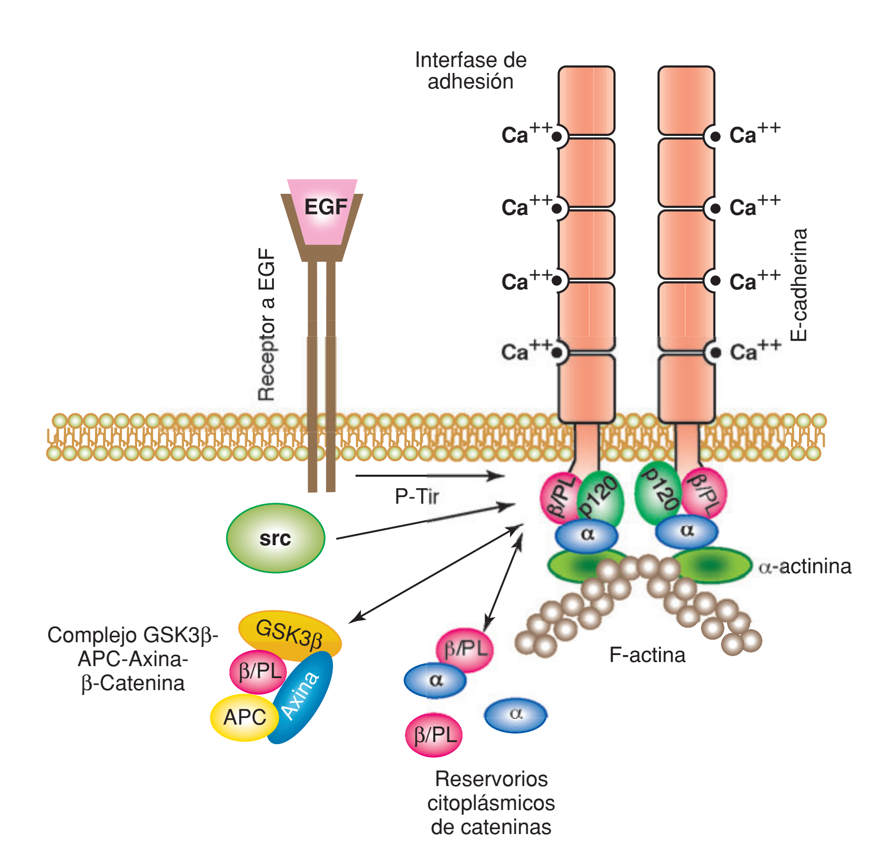


Figura 8-11. Esquema que ilustra la interacción entre la E-cadherina, las cateninas, el citoesqueleto y el receptor a factor de crecimiento epitelial. EGF = factor de crecimiento epitelial; α = α-catenina; β/PL = β-catenina o plakoblobina; p120 = CAS. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

sugieren que comparten un plegado similar. Los extremos amino y carboxilo-terminal de cada repetido se localizan en puntos opuestos, de tal forma que en un arreglo en tándem forman una proteína elongada con forma de red. Los sitios de unión a calcio se forman entre los residuos acídicos del extremo carboxilo-terminal del repetido uno y los aminoácidos acídicos del extremo amino-terminal del repetido 2 y así sucesivamente entre los demás repetidos. Se ha propuesto que los iones de calcio estabilizan los repetidos sucesivos de cadherina al interactuar con los residuos acídicos de los repetidos adyacentes (Shapiro y cols., 1995). Se ha demostrado que la sustitución puntual de aminoácidos del sitio de unión a calcio abate las funciones adhesivas de las cadherinas, por lo que se piensa que, aunque este ion no está involucrado en el sitio de unión homotípica célula-célula, es indispensable para el reconocimiento homofílico entre las moléculas de cadherina de las células vecinas, ya que estabiliza la conformación activa de las cadherinas.

Los estudios cristalográficos sugieren que las moléculas de cadherina en la superficie de membrana se orientan en forma paralela y se dimerizan. Para el reconocimiento homofílico entre moléculas de cadherina de células adyacentes; estos dímeros se agregan a través de motivos histidina-alanina-valina en una superestructura a manera de cremallera. La comparación de secuencias del primer repetido de cadherina indica que las diferentes especificidades de adhesión entre las cadherinas surgen por las variaciones espaciales existentes entre los aminoácidos que median la adhesión.

Función de las cadherinas clásicas

El reconocimiento específico entre cadherinas es crucial durante el desarrollo, ya que permite la selección de células de una población heterogénea para formar subpoblaciones homotípicas. Este proceso se ilustra claramente con la formación del tubo neural y la migración de las células de la cresta neural. Durante la inducción de la placa neural, las células del ectodermo cambian su expresión de E-cadherina por la de N-cadherina. Este cambio permite la segregación de las células precursoras neurales de las demás células del ectodermo. En cambio, las células migrantes de la cresta regulan negativamente la expresión de E- y N-cadherina y comienzan a expresar otras cadherinas que van a mediar su selección en distintas subpoblaciones.

La E-cadherina es una de las moléculas más importantes para el desarrollo de los mamíferos. En la etapa de ocho células se encuentra uniformemente distribuida en las regiones de contacto célula-célula, lo que ocasiona que los blastómeros se aplanen y adhieran fuertemente entre sí y formen una mórula compacta. Por esta crucial función a la E-cadherina se le conoce también como "uvomorulina". Los embriones que no expresan E-cadherina se logran compactar así y todo gracias a la presencia residual de E-cadherina materna. Sin embargo, mueren al momento de la implantación, ya que son incapaces de formar un trofoectodermo funcional.

Las cadherinas para funcionar necesitan estar completas, de manera que al expresar experimentalmente cadherinas que únicamente codifican los dominios extracelular y transmembranal, o solo el citoplásmico, las células no se adhieren y en consecuencia se generan serias anormalidades en el desarrollo (Levine y cols., 1994). La adhesión intercelular, por lo tanto, es un fenómeno complejo en el que además del contacto homotípico entre las cadherinas de dos células vecinas se necesita del anclaje de estas moléculas al citoesqueleto. Para ello se requiere de la participación de las proteínas denominadas cateninas.

Las cateninas

Las cateninas se describieron inicialmente como un conjunto de tres proteínas denominadas α, β y γ (placoglobina) cateninas, que coinmunoprecipitan con E-cadherina. La β-catenina se asocia primero con la E-cadherina, mientras que la α y γ-cateninas se unen posteriormente al complejo. En las células existen cuando menos dos tipos de complejos cadherina-catenina, los dos contienen E-cadherina y α-catenina pero se diferencian en que unos presentan β-catenina y otros placoglobina. La β-catenina o la placoglobina resultan cruciales para el complejo cadherina-catenina; ya que es a través de ellas que se asocia la α-catenina a la cadherina (figura 8-11).

α-catenina (102 kD)

Esta proteína posee tres dominios con 30% de identidad con la vinculina. La α-catenina funciona como vínculo entre la β-catenina y el citoesqueleto, ya que se une a la α-actinina, la cual a su vez se asocia con los microfilamentos de actina (Knudsen y cols., 1995).

Para que el complejo cadherina-catenina sea funcional es necesaria la participación de la α-catenina. Esto ha sido demostrado en una línea celular derivada de carcinoma pulmonar humano (PC9) que no forma contactos intercelulares estables, a pesar de que expresa conspicuamente a la E-cadherina. Esta línea no expresa α-catenina, pero cuando esta proteína se le transfecta, se produce una adhesión intercelular fuerte y las proteínas del complejo de unión ZO-1, E-cadherina y desmoplaquina se redistribuyen a los bordes celulares como normalmente ocurre con las células epiteliales bien polarizadas (Watabe y cols., 1994).

Las cateninas de la familia armadillo

a) Descripción y estructura. Los miembros de esta familia proteica se caracterizan por presentar en su región central un dominio de 45 aminoácidos denominado "armadillo", que se repite de 11 a 13 veces. En esta familia, además de la proteína armadillo de la mosca *Drosophila* y de su homólogo en vertebrados la β-catenina, se encuentran la placoglobina/γ-catenina, las proteínas p120 y APC.

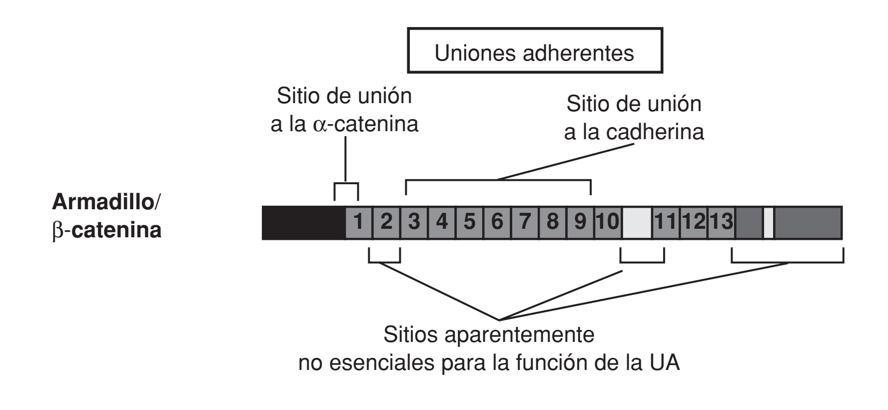
- **La β-catenina/armadillo.** Esta proteína de 88 kDa es multifuncional; es decir, participa en diferentes procesos celulares que ocurren en distintas regiones de la célula. Para ello, combina las características de una proteína estructural de las uniones adherentes con aquellas de un factor de transcripción. Así, tiene sitios de unión a cadherina (repetidos armadillo 3 a 9) y a α-catenina (dominio conservado de 29 aminoácidos ubicado en el límite entre la región amino-terminal y el primer repetido armadillo), esenciales para conectar a la cadherina con el citoesqueleto de actina, y regiones para el señalamiento por la ruta Wingless (figura 8-12) (Aberle y cols., 1996).

  La mayor parte de la β-catenina se encuentra como proteína estructural en la unión adherente y la poca que no se asocia a la unión se degrada rápidamente por el sistema ubiquitina-proteosoma. La estabilización de la β-catenina citoplásmica por la ruta Wingless conduce a su acumulación nuclear, su asociación con el factor de transcripción LEF/TCF y a la transactivación de ciertos genes (Eastman y Grosschedl, 1999). Esta actividad nuclear de la β-catenina modula la determinación del destino celular durante el desarrollo embrionario (Wodarz y Nusse, 1998) y su activación desmedida conduce al cáncer (Morin, 1999). La competencia entre diferentes proteínas que se unen a las cateninas afecta su función. Por ejemplo, la sobreexpresión de cadherinas genera el reclutamiento de la mayor

parte de la β-catenina a las uniones adherentes, y así al reducir la cantidad disponible para acoplarse a LEF/TCF inhibe la transcripción mediada por β-catenina (Orsulic y cols., 1999). En cambio, cuando disminuye la adhesión celular en la transición epitelio-mesénquima, se libera β-catenina de las uniones, lo que contribuye a activar la transcripción dependiente de LEF/TCF (Espada y cols., 1999).

- **La γ-catenina/placoglobina.** Esta proteína de 80 kDa se localiza tanto en las uniones adherentes como en los desmosomas. En las primeras cumple la misma función de la β-catenina ya que se une a las mismas proteínas (E-cadherina y α-catenina) y en los mismos sitios. La cantidad relativa de γ-catenina presente en el complejo cadherina-catenina varía dependiendo del tipo celular, pero suele ser menor a la de β-catenina y de hecho en ocasiones esta ausente. La unión de la β y γ-catenina a las mismas proteínas puede generar competencia entre ellas. Así, la sobreexpresión de placoglobina desplaza a la β-catenina endógena de las uniones adherentes e induce su degradación (Salomon y cols*.,* 1997). En concordancia, en ratones sin placoglobina (*knock-out*), la β-catenina se incorpora a los desmosomas a pesar de que normalmente estas estructuras carezcan de esta proteína (Bierkamp y cols., 1999). En los desmosomas la placoglobina se une a las cadherinas desmosomales desmocolina y desmogleína, a la proteína de la placa desmoplaquina y a las citoqueratinas. Por tanto, funciona como puente que une las proteínas transmembranales del desmosoma con el citoesqueleto de filamentos intermedios.
  La participación de la placoglobina en la ruta de señalización Wingless aún no es clara y estudios recientes sugieren que en esta ruta desempeña un papel distinto al que desempeña la β-catenina (Huelsken y cols., 2000).
- **La proteína APC** es el producto del gen de la adenopoliposis de colon, una predisposición hereditaria del cáncer de colon, en la que secuencialmente se genera sobreproliferación del epitelio, formación de pólipos y desarrollo tumoral. La proteína APC cuando se localiza en el citoplasma está asociada al complejo GSK3β-axina-β-catenina y cuando se ubica en los bordes intercelulares epiteliales y en las sinapsis forma complejos con la proteína *dlg* (Matsumine y cols*.*, 1996). La interacción con *dlg* requiere de la porción carboxilo-terminal de APC y de los tres repetidos PDZ de hDLG.
- **La proteína p120^{cas} (CAS)** es un sustrato de tirosinas-cinasas cuya fosforilación se correlaciona con la transformación inducida por Src. Tiene 11 repetidos armadillo y se asocia directamente a las cadherinas clásicas (E-, P- o N-cadherina) y a la proteína BP1, a través de sus repetidos armadillo (Reynolds y cols., 1996). BP1 es una proteína con dedos de zinc que se localiza en el núcleo y estructuras filamentosas del citoplasma sin actina y tubulina (Daniel y Reynolds, 1996). CAS no se une a APC o α-catenina.

b) La degradación de la β-catenina y el señalamiento por la vía Wingless (WG/WNT). Las dos funciones conocidas de la proteína armadillo/β-catenina, el señalamiento a través de la ruta Wingless (WG/WNT) y la adhesión inter-



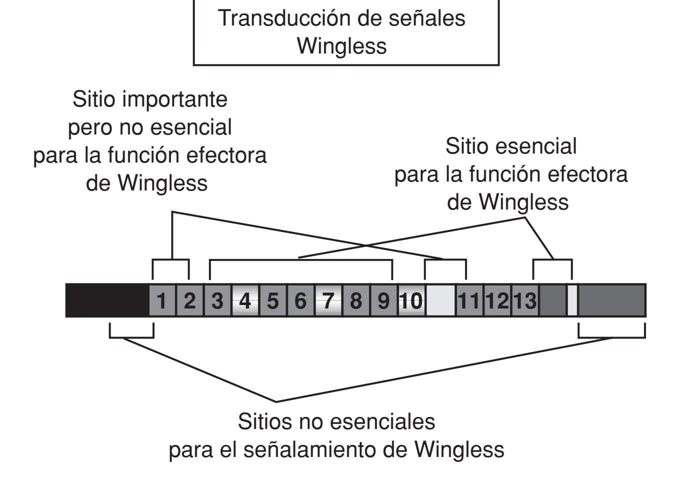


Figura 8-12. Diagrama de la proteína armadillo/β-catenina que indica las diferentes porciones de la molécula que participan en la asociación a las uniones adherentes y en la ruta Wingless de transducción de señales. Los repetidos armadillo de esta proteína aparecen numerados.

celular, se llevan cabo por medio de distintas regiones de la molécula (Sanson y cols., 1996) (figura 8-12). La regulación de la adhesión intercelular por la armadillo/β-catenina se manifiesta cuando ésta se asocia en la membrana a la cadherina; en cambio, la activación de la ruta WG/WNT ocurre cuando se presenta una cantidad superior de armadillo/β-catenina de la que puede ser titulada en la membrana por la E-cadherina y entonces ésta se acumula en el citoplasma, viaja al núcleo y regula la expresión de ciertos genes.

La degradación de la β-catenina en el proteosoma ocurre cuando la vía Wingless no está activada. Entonces, la β-catenina citoplásmica, que forma parte de un complejo multiproteico constituido por el supresor tumoral APC, la axina y la glucógeno-sintetasa-cinasa (GSK), es fosforilada en residuos de serina de su extremo amino-terminal por la GSK. Esta cinasa no puede fosforilar eficientemente a la β-catenina *in vitro*, ya que necesita el soporte de la axina. Esta última funciona como un andamio que sostiene tanto a la β-catenina como a la GSK. La β-catenina fosforilada es reconocida por la ubiquitina-ligasa-β-TrCP, que cataliza su adhesión a los péptidos de ubiquitina y su posterior degradación en el proteosoma (figura 8-13) (Kikuchi, 2000).

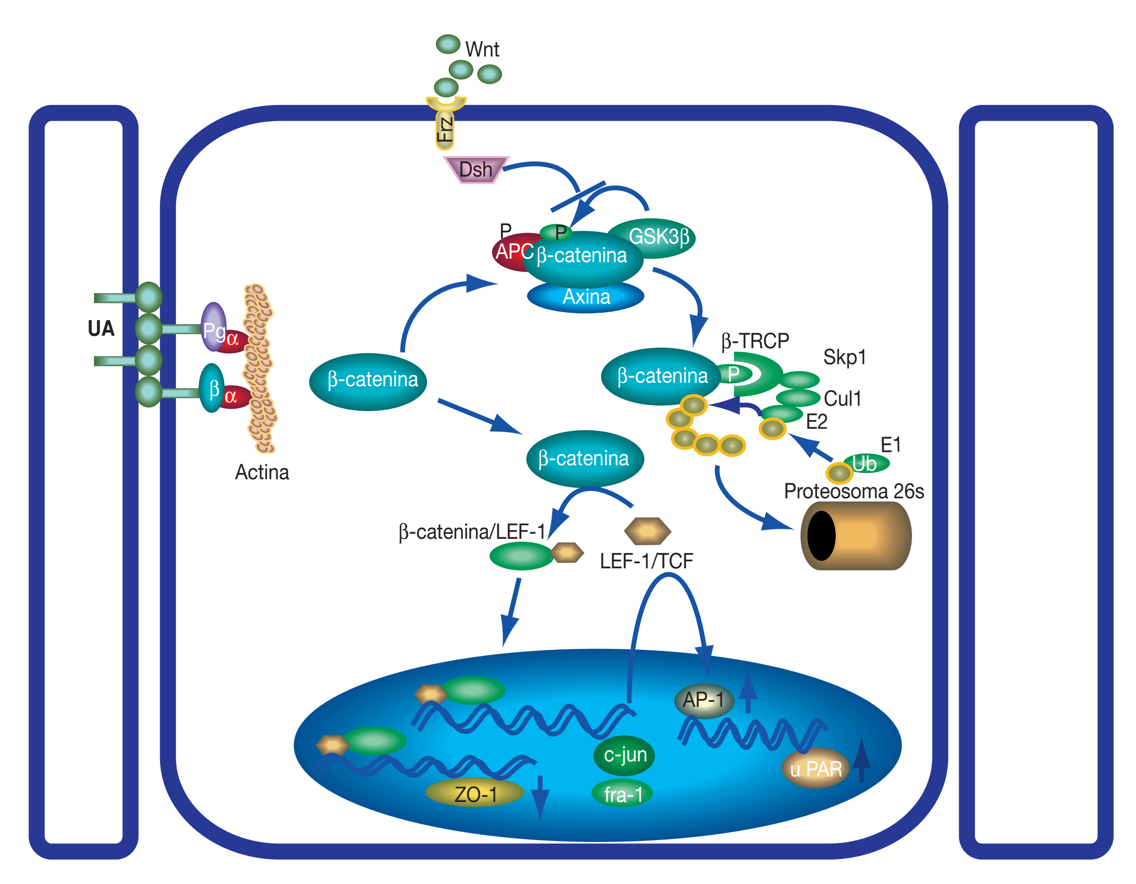


Figura 8-13. Ruta wingless de transducción de señales. Cuando se activa la ruta Wingless, la proteína Wnt se asocia a su receptor frizzled (Frz). En seguida la proteína dishevelled (Dsh) bloquea la fosforilación de la β-catenina por la GSK3β. La β-catenina no fosforilada se asocia en el citoplasma al factor de transcripción LEF-1/TCF y viaja al núcleo donde regula la expresión de ZO-1, del factor de transcripción AP-1 y de la metaloproteinasa uPAR. Cuando la ruta Wingless esta inactiva, la GSK3β fosforila a la β-catenina y a APC. La β-catenina fosforilada es ubiquitinada y posteriormente degradada en el protesosoma. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

La ruta de transducción de señales WG/WNT en la que participa la armadillo/β-catenina fue descrita inicialmente como la responsable de la polaridad segmentaria en los embriones de *Drosophila.* Esta vía también se presenta en vertebrados, donde regula la formación del mesodermo y el eje embrionario.

La vía WG/WNT se activa cuando la proteína Wingless (WG)/(WNT) se secreta y se une a su receptor *frizzled* (figura 8-13). Esta unión ligando-receptor induce el reclutamiento a la membrana plasmática de la proteína *dishevelled* (Dsh). Dsh regula negativamente a la GSK y por tanto inhibe la fosforilación de β-catenina y su ulterior degradación. La β-catenina acumulada en el citoplasma se une al factor de transcripción LEF/TCF. Este complejo se transloca al núcleo donde se une a la región promotora de ciertos genes (E-cadherina y *siamois*) y regula su transcripción.

La placoglobina también es dirigida a degradación en el proteosoma por el complejo axina-APC y es capaz de unirse al factor de transcripción

LEF/TCF. Sin embargo, su participación en la señalización por la ruta Wingless es controversial debido a que es incapaz de compensar la ausencia de β-catenina en ratones *knock-out* (Huelsken y cols., 2000).

La β-catenina no contiene en su secuencia señales de direccionamiento nuclear, por tanto su importación al núcleo depende de otros mecanismos. Uno se basa en la interacción directa entre la β-catenina y la proteína del poro nuclear nucleoporina Nup1 (Fagotto y cols., 1998) y el otro es mediado por las señales de direccionamiento nuclear presentes en el factor de transcripción LEF/TCF al que se asocia la β-catenina.

La importancia de la ruta de señalización Wingless en el control del destino celular se manifiesta claramente en *Drosophila*, donde las mutaciones en cualquiera de los genes de la ruta generan un fenotipo idéntico, que consiste en el reemplazo de la parte posterior de cada segmento embrionario por una duplicación de imagen especular de la parte anterior. En *Xenopus* se ha visto que la sobreexpresión de LEF, β o γ-catenina, o de sus repetidos armadillo, induce la duplicación del eje antero-posterior, lo que genera un embrión con 2 cabezas (siamés). La proteína sobreexpresada se acumula en el núcleo y no en los bordes celulares (Funayama y cols., 1995; Huber y cols., 1996).

La fosforilación como sistema de regulación de los complejos cadherina-catenina

La integridad de la unión adherente es regulada negativamente por fosforilación en tirosinas. Esta fosforilación puede inducirse con el oncogen *Ras* o con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su sustrato es la β-catenina o la placoglobina. Éstas, una vez fosforiladas, se disocian del complejo cadherina-catenina (Kinch y cols., 1995). El receptor a EGF está asociado al complejo cadherina-catenina a través de los repetidos armadillo de las cadherinas (figura 8-11) (Hoschuetzky y cols., 1994).

> La integridad de la unión adherente es regulada negativamente por fosforilación en tirosinas.

El nivel de fosforilación celular se regula tanto por activación de cinasas como por la inhibición de las fosfatasas. Por ejemplo, en la retina de pollo existe una tirosina fosfatasa denominada 1B (PTP1B) que al asociarse a la N-cadherina y desfosforilarla regula la adhesión intercelular (figura 8-14) (Balsamo y cols., 1996). Esta tirosina fosfatasa no parece ser la única con esta función ya que en diferentes tipos celulares se han encontrado otras acopladas al complejo cadherina-catenina (Kypta y cols., 1996).

La proteína CAS, miembro de la familia armadillo, es otra de las moléculas del complejo cadherina-catenina que es sustrato de tirosinas cinasas. En células estimuladas con el EGF, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1) Cas se fosforila en residuos de tirosinas (Reynolds y cols., 1996).

En resumen, estos resultados indican que la fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas de la familia armadillo que se ubican en la unión adherente, desempeña un papel importante en el mantenimiento de la adhesión intercelular. También sugieren que el señalamiento inducido por factores como el EGF puede conducir a la transformación celular a través de la pérdida de la integridad epitelial.

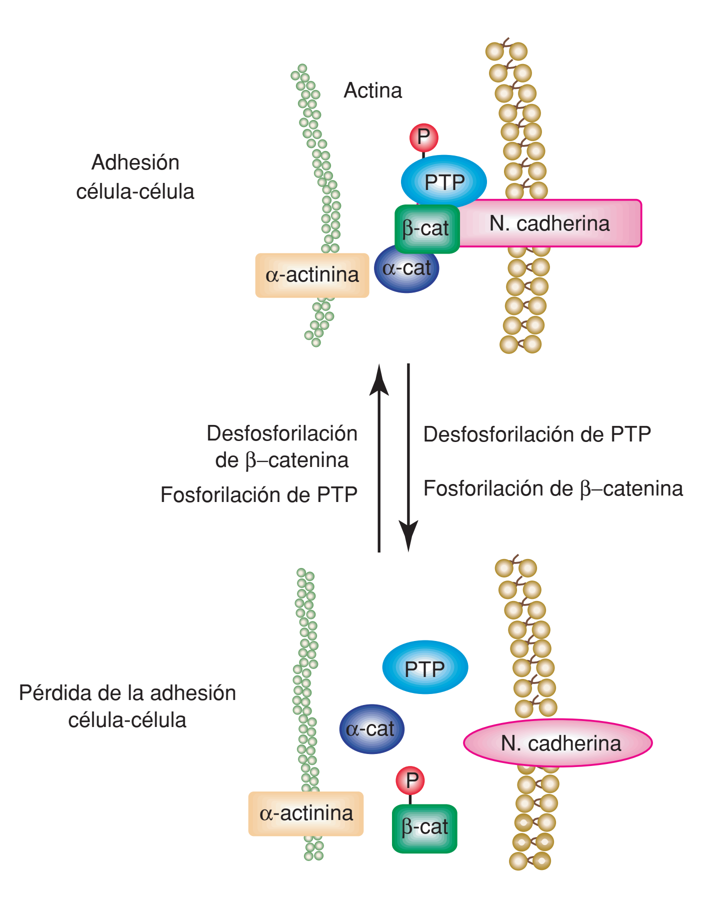


Figura 8-14. Diagrama que ilustra los efectos de la fosforilación de la fosfatasa PTP1B y de la β-catenina sobre la adhesión intercelular. La fosforilación de la fosfatasa PTP1B regula su asociación con la N-cadherina y la fosforilación en residuos de tirosina de la β-catenina controla la estabilidad del complejo cadherina-cateninas. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

Organización del complejo cadherina-catenina-actina durante el desarrollo de la adhesión célula-célula

El contacto entre las células epiteliales se inicia por medio de la interacción homofílica entre las cadherinas de las células vecinas. Este contacto genera la formación de microdominios discretos en los que colocalizan E-cadherina, α- y β-catenina. Conforme transcurre el tiempo los microdominios crecen y se funden. Una vez que la unión adherente queda firmemente establecida se ensamblan los desmosomas, las uniones estrechas y las uniones comunicantes (Adams y cols., 1996). Si el contacto inicial se inhibe con anticuerpos anticadherina no se establecen el resto de las uniones intercelulares (Gumbiner y cols., 1988).

Antes de iniciarse el contacto intercelular, las moléculas de E-cadherina, α- y β-catenina forman un complejo soluble en el citoplasma. Cuando se inicia la adhesión este complejo se recluta a la membrana y se vuelve insoluble en el detergente Tritón X-100, lo que demuestra que se ha anclado al citoesqueleto. En esta condición las proteínas E-cadherina, α- y β-catenina se presentan en proporción de 1:1:1. Durante la formación inicial de los contactos célula-célula la placoglobina no se asocia al complejo, sino que se integra posteriormente, cuando las uniones adherentes ya están bien establecidas. Esto sugiere que mientras que la β-catenina juega un papel impor-

tante en la formación de nuevos contactos, la placoglobina esta involucrada en su subsecuente estabilización.



Conclusiones

El complejo de unión intercelular está constituido por 4 tipos diferentes de uniones: adherentes, estrechas, comunicantes y desmosomas. En este capítulo se ha revisado la estructura y función de las dos primeras.

La información sobre las uniones adherentes y estrechas se ha enriquecido notablemente en los últimos años gracias a la identificación y caracterización molecular de sus componentes. Se trata de conglomerados proteicos en los que las distintas moléculas que los integran, además de participar en la interacción célula-célula transducen distintas señales. El conocimiento sobre estas uniones ayuda a comprender los procesos de diferenciación y transformación celular.



Referencias bibliográficas

Aberle, H.; Schwartz, H.; Hoschuetsky, H. y Kemler, R., "Single aminoacid substitutions in proteins of the armadillo gene family abolish their binding to α-catenin", *J. Biol. Chem.,* **271:** 1520-1526, 1996.

Adams, C.L.; Nelson, W.J. y Smith, S.J., "Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion", *J. Cell Biol.,* **135:** 1899-1911, 1996.

Anderson, J.M. y Van Itallie, C.M., "Tight junctions and the molecular basis for regulation of the paracellular permeability", *Am. J. Physiol.,* Gastrointest., Liver Physiol., **269:** G467-G475, 1995.

Antonetti, D.A.; Barber, A.J.; Hollinger, L.A.; Wolpert, E.B. y Gardner, T.W., "Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1", *J. Biol. Chem.,* **274:** 23463-23467, 1999.

Ávila-Flores, A.; Rendón-Huerta, E.; Moreno, J.; Islas, S.; Betanzos, A.; Robles-Flores, M. y González-Mariscal, L., 2001. "Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosporylation by protein kinase C", *Biochem. J.* **360:** 292-304.

Balda, M.S.; Anderson J.M. y Matter, K., "The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain", *FEBS Lett.,* **399:** 326-332, 1996b.

———— ; González-Mariscal, L.; Contreras, R.G.; Macías-Silva, M.; Torres-Márquez, M.E., García-Sainz, J.A. y Cereijido, M., "Assembly and Sealing of Tight junctions: Possible participation of G-Proteins, Phospholipase C, Protein Kinase C and Calmodulin", *J. Membrane Biol.*, **122:** 193-202, 1991.

———— ; González-Mariscal, L.; Matter, K.; Cereijido, M. y Anderson, J.M., "Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol", *J. Cell Biol.,* **123:** 293-302, 1993.

———— ; Whitney, J.A.; Flores, C.; Gónzalez, S.; Cereijido, M. y Matter, K., "Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial

electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein", *J. Cell Biol.,* **134:** 1031-1049, 1996a.

——— y Matter, K., "The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate Erb-2 expression", *EMBO J.,* **19:** 2024-2033, 2000.

Balsamo, J.; Leung, T.C.; Ernst, H.; Zanin, M.K.B., Hoffman, S. y Lilien, J., "Regulated binding of a PTP1B-like phosphatase to N-cadherin: control of cadherin-mediated adhesion by dephosphorylation of β-catenin", *J. Cell Biol.,* **134:** 801-813, 1996.

Baumgartner, S.; Littleton, J.T.; Broadie, K.; Bhat, M.A.; Haebecke, R.; Lengyel, J.A.; Chiquet-Ehrismann, R.; Prokop, A. y Bellen, H.J., "A Drosophila neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function", *Cell,* **87:** 1059-1068, 1996.

Beatch, M.; Jesaitis, L.A.; Gallin, W.J.; Goodenough, D.A. y Stevenson, B.R., "The tight junction protein ZO-2 contains three PDZ (PSD-95/Discs-large/ZO-1) domains and an alternatively spliced region", *J. Biol. Chem.*, **271:** 25723-25726, 1996.

Bierkamp, C.; Schwarz, H.; Huber, O. y Kemler, R., "Desmosomal localization of β-catenin in the skin of plakoglobin null-mutant mice", *Development,* **126:** 371-381, 1999.

Bilder, D.; Li, M. y Perrimon, N., "Cooperative regulation of cell polarity an growth by *Drosophila* tumor supressors", *Sci.,* **289:** 113-116, 2000.

Brenman, J.E.; Chao, D.S.; Gee, S.H.; McGee, A.W.; Craven, S.E.; Santillano, D.R.; Wu, Z.; Huang, F.; Xia, H.; Peters, M.F.; Froehner, S.C. y Bredt, D.S., "Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α-1-syntrophin mediated by PDZ domains", *Cell,* **84:** 757-767, 1996.

Bryant, P.J.; Watson, K.L.; Justice, R.W. y Woods, D.F., "Tumor suppressor genes encoding proteins required for cell interaction and signal transduction in Drosophila", *Dev. Biol.,* Suppl., 293-249, 1993.

Buchert, M.; Schneider, S.; Meskenaite, V.; Adams, M.T.; Canaani, E.; Baechi, T.; Moelling, K. y Hovens, C.M., "The junction associated protein AF-6 interacts and clusters with specific Eph receptor tyrosine kinases at specialized sites of cell-cell contact in the brain", *J. Cell Biol.*, **144:** 361-371, 1999.

Carlson, C.; Sirotkin, H.; Pandita, R.; Goldberg, R.; McKie, J.; Wadey, R.; Patanjali, S.R.; Weissman, S.M.; Anyane-Yeboa, K.; Warburton, D.; Scambler, P.; Shprintzen, R.; Kucherlapati, R. y Morrow, B.E., "Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo–cardio-facial syndrome patients", *Am. J. Hum. Genet.,* **61:** 620-629, 1997.

Cereijido, M., "Evolution of ideas on the tight junction", en *Tight junctions*, Boca Raton, Florida, CRC., 1-13, 1992.

——— ; Contreras, R.G. y González-Mariscal, L., "Development and alteration of polarity", *An. Rev. Physiol.,* **51:** 785-795, 1989a.

——— ; Ponce, A. y González-Mariscal, L., "Tight junctions and apical/basolateral polarity", *J. Membrane Biol.,* **110:** 1-9, 1989b.

——— ; Robbins E.S.; Dolan W.J.; Rotunno C.A. y Sabatini, D.D., "Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support", *J. Cell Biol.,* **77:** 853-880, 1978.

Chen, Y.H.; Paul, D.L. y Goodenough, D., "Demonstration of a direct role for the protein occludin in the barrier function of tight junctions", *Mol. Biol. Cell*, Suppl., **7:** 606a, 1996.

Chlenski, A.; Ketels, K.V.; Tsao, M.; Talamonti, M.S.; Anderson, M.R.; Oyasu, R. y Scarpelli, D.G., "Tight junction protein ZO-2 is differentially expressed in nor-

mal pancreatic ducts compared to human pancreatic adenocarcinoma", *Int. J. Cancer,* **82:** 137-144, 1999.

Citi, S., "Protein kinase inhibitors prevent junction dissociation induced by low extracellular calcium in MDCK epithelial cells", *J. Cell Biol.,* **117:** 169-178, 1992.

———— ; Sabbanay, H.; Jakes, R.; Geiger, B. y Kendrich-Jones, J., "Cingulin, a new peripheral component of tight junctions", *Nature,* **333:** 272-275, Londres, 1988.

———— y Denisenko, N., "Phosphorylation of the tight junction protein cingulin and the effects of protein kinase inhibitors and activators in MDCK epithelial cells", *J. Cell Sci.,* **108:** 2917-2926, 1995.

Cohen N.A.; Brenman J.E.; Snyder S.H. y Bredt D.S., "Binding of the inward rectifier K channel Kir 2.3 to PSD-95 is regulated by protein kinase A phosphorylation", *Neuron,* **17:** 759-767, 1996.

Collares-Buzato, C.B.; Jepson, M.A.; Simmons, N.L. y Hirst, B.H., "Increased tyrosine phosphorylation causes redistribution of adherens junction and tight junction proteins and perturbs paracellular barrier function in MDCK epithelia", *Eur. J. Cell Biol.,* **76:** 85-92, 1998.

Collins, J.R. y Rizzolo, L., "Protein binding domains of the tight junction protein ZO-2, are highly conserved between avian and mammalian species", *Biochem. Biophys. Res. Comm.,* **252:** 617-622, 1998.

Contreras, R.G.; Ponce, A. y Bolívar, J.J., "Calcium and tight junctions", *Tight Junctions,* Cereijido, M., ed., CRC Press, Londres, 139-150, 1992.

Cordenonsi, M.; D'Atri, A.F.; Hammar, E.; Parry, D.A.D.; Kendrick-Jones, J.; Shore, D. y Citi, S., "Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3 and myosin", *J. Cell Biol.,* **147:** 1569-1581, 1999.

Daniel, J.M. y Reynolds, A.B., "The catenin $p120^{cas}$ associates with a novel Zn finger protein", *Mol. Biol. Cell,* Suppl., **7:** 457a, 1996.

Deguchi, M.; Hata, Y.; Takeuchi, M.; Ide, N.; Hirao, K.; Yao, I.; Irie, M.; Toyoda, A. y Takai, Y., "BEGAIN (brain-enriched guanylate kinase-associated protein), a novel neuronal PSD-95/SAP90-binding protein", *J. Biol. Chem.,* **273:** 26269-26272, 1998.

Denisenko, N.; Burighel, P. y Citi, S., "Different effects of protein kinase inhibitors on the localization of junctional proteins at cell-cell contact sites", *J. Cell Sci.,* **107:** 969-981, 1994.

Diamond, J., "The epithelial tight junction: bridge, gate and fence", *Physiologist,* **20:** 10-18, 1977.

Dobrosotskaya, I.; Guy, R.K. y James, G.L., "MAGI-1, a membrane associated guanylate kinase with a unique arrangement of protein/protein interaction domains", *J. Biol. Chem.,* **272:** 31589-31597, 1997.

Eastman, Q. y Grosschedl, R., "Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals", *Curr. Opin. Cell Biol.,* **11:** 233-240, 1999.

Espada, J.; Pérez-Moreno, M.; Braga, V.; Rodríguez-Viciana, P. y Cano, A., "H-Ras activation promotes cytoplasmic accumulation and phosphoinositide 3-OH kinase association of β-catenin in epidermal keratinocytes", *J. Cell Biol.,* **132:** 1105-1114, 1999.

Fagotto, F.; Gluck, U. y Gumbiner, B., "Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of β-catenin". *Curr., Biol.,* **8:** 181-190, 1998.

Fanning, A.S.; Jameson, B.J.; Jesaitis, L.A. y Anderson, J.M., "The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton", *J. Biol. Chem.,* **273:** 29745-29755, 1998.

Farquhar, M.G. y Palade, G.E., “Junctional complexes in various epithelia”, *J. Cell Biol.,* **17:** 375-412, 1963.

Fish, E.M. y Molitoris, B.A., “Alterations in epithelial polarity and pathogenesis of disease states”, *N. Eng. J. Med.,* **330:** 1580-1588, 1994.

Fleming, T.P.; McConnell, J.; Johnson, M.H. y Stevenson, B.R., “Development of tight junctions de novo in the mouse early embryo: control of assembly of the tight junction-specific protein ZO-1”, *J. Cell Biol.,* **108:** 1407-1418, 1989.

Funayama, N.; Fagotto, F.; McCrea, P. y Gumbiner, B.M., “Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain: Evidence for intracellular signalling”, *J. Cell Biol.,* **128:** 959-968, 1995.

Furuse, M.; Fujita, K.; Hiiragi, T.; Fujimoto, K. y Tsukita, S., “Claudin-1 and –2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin”, *J. Cell Biol.,* **141:** 1539-1550, 1998a.

———— ; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S. y Tsukita, S., “Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions”, *J. Cell Biol.,* **123:** 1777-1788, 1993.

———— ; Sasaki, H.; Fujimoto, K. y Tsukita, S., “A single gene product, claudin-1 or –2, reconstitutes TJ strands and recruits occludin in fibroblasts”, *J. Cell Biol*., **143:** 391-401, 1998b.

Gabbert H.; Wagner R.; Moll R. y Gerharz, C.D., “Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion”, *Clin. Exp. Metastasis,* **3:** 257-279, 1985.

Garcia, E.; Mehta, S.; Blair, L.A.C.; Wells, D.G.; Shang, J.; Fukushima, T.; Fallon, J.R.; Garner, C.C. y Maeshall, J., “SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization”, **21:** 727-739, 1998.

González-Mariscal, L.; Ávila, A. y Betanzos, A., “The relationship between structure and function of tight junctions”, en *Tight Junctions,* Anderson, J.M. y Cereijido, eds., M. CRC press, Boca Raton, Florida, 2001.

———— ; Chávez de Ramírez, B. y Cereijido, M., “Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK)”, *J. Membrane Biol.,* **86:** 113-125, 1985.

————; Contreras, R.G.; Bolívar, J.J.; Ponce, A.; Chávez de Ramírez, B. y Cereijido, M., “Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells”, *Am. J. Physiol.,* (Cell Physiol.): C978-C986, 1990.

———— ; Contreras, R.G.; Valdés, J.; García-Villegas, R. y Cereijido, M., “Extracellular and intracellular regulation of junction assembly in epithelial cells”, en *Molecular Mechanism of epithelial Cell Junctions: From Development to disease*, Citi, S., ed., R.G. Landes Co., 107-121, 1994.

———— ; Islas S.; Contreras R.G.; García-Villegas, M.R.; Betanzos, A.; Vega, J.; Díaz-Qiñones, A.; Martín-Orozco, N.; Ortíz-Navarrete, V.; Cereijido, M. y Valdés, J., “Molecular characterization of the tight junction protein ZO-1 in MDCK cells”, *Exp. Cell Res.,* **248:** 97-109, 1999a.

———— ; Islas, S.; González-Robles, A. y Ponce, L., “Expression of the tight junction associated protein ZO-2 at the nuclei of subconfluent epithelial cells”, *Mol. Biol., Cell,* **10S:** 2358, 1999b.

———— ; Namorado, M.C.; Martín, D.; Luna, J.; Alarcón, L.; Islas, S.; Valencia, L.; Muriel, P.; Ponce, L. y Reyes, J.L., “Tight junction proteins ZO-1, ZO-2 and occludin along isolated renal tubules”, *Kidney Int.,* **57:** 2386-2402, 2000.

Goodenough, D.A. y Wong, V., “Paracellular channels!”, *Science,* **285:** 62, 1999.

Gottardi, C.J.; Arpin, M.; Fanning, A.S. y Louvard, D., “The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts”, *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **93:** 10779-10784, 1996.

Gumbiner, B.; Lowenkopf, T. y Apatira, D., "Identification of 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **88:** 3460-3464, 1991.

———— ; Stevenson, B.R. y Grimaldi, A., "Role of the cell adhesion molecule uvomorulin in formation and maintenance of the epithelial junctional complex", *J. Cell Biol.,* **107:** 1575-1587, 1988.

Haskins, J.; Gu, L.; Wittchen, E.S.; Hibbard, J. y Stevenson, B.R., "ZO-3 a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interact with ZO-1 and occludin", *J. Cell Biol.,* **141:** 199-208, 1998.

Hata, Y.; Butz, S. y Sudhof, T.C., "Cask: a novel dlg/PSD95 homologue with an n-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with Neurexins", *J. Neuroscie.,* **16:** 2488-2494, 1996.

Hatzfeld, M. y Nachtsheim, C., "Cloning and characterization of a new *armadillo* family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence of a subfamily of closely related proteins", *J. Cell Scie.,* **109:** 2767-2778, 1996.

Hirase, T.; Staddon, J.M.; Saitou, M.; Furuse, M.; Tsukita, Sh. y Rubin, L.L., "Occludin in endothelial cells", *Mol. Biol. Cell,* Suppl., **7:** 605a, 1996.

Hoover, K.B. y Liao, S.Y., "Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity", *Am. J. Pathol.,* **153:** 1767-1773, 1998.

Hoschuetzky, H.; Aberle, H. y Kemler, R., "β-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with the epidermal growth factor receptor", *J. Cell Biol.,* **127:** 1375-1380, 1994.

Hoskins, R.; Hajnal, A.F.; Harp, S.A. y Kim, S., "The C. elegans vulval induction gene lin 2-A encodes a membrane of the MAGUK family of cell junction proteins", *Development,* **122:** 97-111, 1996.

Howarth, A.G.; Hughes, M.R. y Stevenson, B.R., "Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other non epithelial cell types", *Am. J. Physiol.,* **262:** C461-C469, 1992.

Hsueh, Y.; Wang, T.; Yang, F. y Sheng, M., "Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2", *Nature,* **404:** 298-302, 2000.

Huber, O.; Korn, R.; McLaughlin, J.; Ohsugi, M.; Herrmann, B. y Kemler, R., "Nuclear localization of β-catenin by interaction with transcription factor LEF-1", *Mech. Develop.,* **59:** 3-10, 1996.

Huelsken, J.; Vogel, R.; Brinkmann, V.; Erdmann, B.; Birchmeier, C. y Birchmeier, W., "Requirement for β-catenin in anterior-posterior axis formation in mice", *J. Cell Biol.,* **148:** 567-578, 2000.

Ide, N.; Hata, Y.; Nishioka, H.; Hirao, K.; Yao, I.; Deguchi, M.; Mizoguchi, A.; Nishimori, H.; Tokino, T.; Nakamura, Y. y Takai, Y., "Localization of membrane associated guanylate kinase (MAGI)-1/BAI-associated protein (BAP) 1 at tight junctions of epithelial cells", *Oncogene,* **18:** 7810-7815, 1999.

Inai, T.; Kobayashi, J. y Shibata, Y., "Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells", *Eur. J. Cell Biol.,* **78:** 849-855, 1999.

Irie, M.; Hata, Y.; Takeuchi, M.; Ichtckenko, K.; Toyoda, A.; Hirao, K.; Takai, Y.; Rosahl, T.W. y Sudhof T.C., "Binding of neuroligins to PSD-95", *Science,* **277:** 1511-1515, 1997.

Islas, S.; Vega, J.; Ponce, L. y González-Mariscal, L., "Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in ephitelial cells"., *Exp. Cell Res.* **274:** 138-148, 2002.

Itoh, M.; Morita, K. y Tsukita, S., "Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherent junctions with a binding affinity to occludin and a catenin", *J. Biol. Chem.,* **274:** 5981-5986, 1999.

———— ; Nagafuchi, A.; Moroi, S. y Tsukita, S., "Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to a catenin and actin filaments", *J. Cell Biol.,* **138:** 181-192, 1997.

———— ; Yonemura, S.; Nagafuchi, A. y Tsukita, S., "A 220-kD undercoat-constitutive protein: its specific localization at cadherin-based cell-cell adhesion sites", *J. Cell Biol.,* **115:** 1449-1462, 1991.

Jesaitis, L.A. y Goodenough, D.A., "Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein", *J. Cell Biol.,* **124:** 949-961, 1994.

Katahira, J.; Sugiyama, H.; Inoue, H.; Horiguchi, Y.; Matsuda M. y Sugimoto, N., "*Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors *in vivo*", *J. Biol. Chem.,* **272:** 26652-26658, 1997.

Katsube, T.; Takahisa, M.; Ueda, R.; Hashimoto, N.; Kobayashi, M. y Togashi, S., "Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and Mouse", *J. Biol. Chem.,* **273:** 29672-29677, 1998.

Keon, B.H.; Schafer, S.; Kuhn, C.; Grund, C. y Franke, W., "Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein", *J. Cell Biol.,* **134:** 1003-1018, 1996.

Kikuchi, A., "Regulation of β-catenin signaling in the Wnt pathway", *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **268:** 243-248, 2000.

Kim, E.; Cho, J.; Rothschild, A. y Sheng, M., "Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of chapsyn-110 a member of the PSD-95 family of proteins", *Neuron,* **17:** 103-113, 1996.

———— ; Naisbitt, S.; Hsueh, Y.; Rao, A.; Rothschild, A.; Craig, A.M. y Sheng, M., "GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules", *J. Cell Biol.,* **136:** 669-678, 1997.

———— ; Niethammer, M.; Rothschild, A.; Jan, Y.N. y Sheng, M., "Clustering of shaker-type K^+ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases", *Nature,* **378:** 85-88, 1995.

Kim, S.K., "Tight junctions, membrane associated guanylate kinases and cell signaling", *Curr. Opin. Cell Biol.,* **7:** 641-649, 1995.

Kinch, M.S.; Clark, G. J.; Der, C.J. y Burridge, K., "Tyrosine phosphorylation regulates the adhesions of ras-transformed breast epithelia", *J. Cell Biol.,* **130:** 461-471, 1995.

Kirkpatrick, C. y Peifer, M., "Not just glue: cell-cell junctions as cellular signaling centers", *Curr. Opin. Genet. Dev.,* **5:** 56-65, 1995.

Knudsen, K.A.; Peralta-Soler, A.P.; Johnson, K.R. y Wheelockk, M.J., "Interaction of α-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via α-catenin", *J. Cell Biol.,* **130:** 67-77, 1995.

Kornau, H.C.; Schenker, L.T.; Kennedy, M.B. y Seeburgh, P.H., "Domain interactions between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95", *Science,* **269:** 1737-1740, 1995.

Kurihara, H.; Anderson, J.M. y Farquhar, M.G., "Diversity among tight junctions in rat kidney: glomerular slit diaphragms and endothelial junctions express only one isoform of the tight junction protein ZO-1", *Proc. Natl. Acad. Scie.,* **89:** 7075-7079, EE.UU., 1992.

Kypta, R.M.; Su, H. y Reichardt, L., "Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex", *J. Cell Biol.,* **134:** 1519-1529, 1996.

Lahey, T.; Goroczyca, M.; Jia, X. y Budnik, V., "The Drosophila tumor suppresor gene dlg is required for normal synaptic bouton structure", *Neuron,* **13:** 823-835, 1994.

Lehel, C.; Oláh, Z.; Petrovics, G.; Jakab, G. y Anderson, W.B., "Influence of various domains of protein kinase Cε on its PMA-induced translocation from the Golgi to the plasma membrane", *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **223:** 98-103, 1996.

Levine, E.; Lee, C.H.; Kintner, C. y Gumbiner, B.M., "Selective disruption of E-cadherin function in early Xenopus embryos by a dominant negative mutant", *Development,* **120:** 901-909, 1994.

Lue, R.; Marfatia, S.M.; Branton, D. y Chishti, A., "Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the Drosophila disc large tumor suppresor binds to protein 4.1", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **91:** 9818-9822, 1994.

Lue, R.A.; Brandin, E.; Chan, E.P. y Branton, D., "Two independent domains of hDlg are sufficient for subcellular targeting: The PDZ1-2 conformational unit and an alternatively spliced domain", *J. Cell Biol.,* **135:** 1125-1137, 1996.

Madara, J.L., "Intestinal Absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton", *Am. J. Physiol.,* **253:** C171-C175, 1987.

———, Barenberg, D. y Carlson, S., "Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity", *J. Cell Biol.*, **102:** 2125-2136, 1986.

——— y Papenhaimery J.R., "Estructural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia", *J. Membr. Biol.,* **100:** 149-164, 1987.

Mandai, K.; Nakanishi, H.; Satoh, A.; Obaishi, H.; Wada, M.; Nishioka, H.; Itoh, M.; Mizoguchi, A.; Aoki, T.; Fujimoto, T.; Matsuda, Y.; Tsukita, S. y Takai, Y., "Afadin: a novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localizes at cadherin-based cell-to-cell adherens junctions", *J. Cell Biol.,* **139:** 517-528, 1999.

Marfatia, S.; Lue, R.A.; Branton, D. y Chishti, A.H., "*In vitro* binding studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein 4.1, and glycophorin C", *J. Biol. Chem.,* **269:** 8631-8634, 1994.

Marfatia, S.M.; Morais-Cabral, J.H.; Lin, L.; Hough, C.; Bryant, P.J.; Stolz, L. y Chishti, A.H., "Modular organization of the PDZ domains in the human disc-large protein suggest a mechanism for coupling PDZ domain-binding proteins to ATP and the membrane cytoskeleton", *J. Cell Biol.*, **135:** 753-766, 1996.

Martin-Padura, I.; Lostaglio, S.; Schneemann, M.; Williams, L.; Romano, M.; Fruscella, P.; Panzeri, C.; Stoppacciaro, A.; Ruco, L.; Villa, A.; Simmons, D. y Dejana, E., "Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration", *J. Cell Biol.,* **142:** 117-127, 1998.

Martinez-Estrada, O.M.; Villa, A.; Breviario, F.; Orsenigo, F.; Dejana, E. y Bazzoni, G., "Association of junctional adhesion molecule with calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK/LIN-2) in human epithelial Caco-2 cells", *J. Biol. Chem.,* **276:** 9291-9296, 2001.

Matsumine, A.; Ogai, A.; Senda, T.; Okumura, N.; Satoh, K.; Baeg, G.; Kawahara, T.; Kobayashi, S.; Okada, M.; Toyoshima, K. y Akiyama, T., "Binding of APC to the human homolog of the Drosophila discs large tumor suppresor protein", *Science,* **272:** 1020-1023, 1996.

Mattagajasingh, S.N.; Juang, S.C.; Hartenstein, J.S. y Benz, E.J., "Protein 4.1R interacts with zonula occludens-2 (ZO-2) and possibly links the tight junction with the actin cytoskeleton", *Mol. Biol. Cell,* **10S:** 2357, 1999.

Meza, I.; Sabanero, M.; Stefani, E. y Cereijido, M., "Occluding Junctions in MDCK cells: Modulation of transepithelial permeability by cytoskeleton", *J. Cell Biochem.,* **18:** 407-421, 1982.

Morais-Cabral, J.H.; Petosa, C.; Sutcliffe, M.J.; Raza, S.; Byron, O.; Poy, F.; Marfatia, S.M.; Chishti, A.H. y Liddington, R.C., "Crystal structure of a PDZ domain", *Nature,* **382:** 649-652, 1996.

Morin, P., "β-catenin signaling and cancer", *BioEssays,* **21:** 1021-1030, 1999.

Morita, K.; Furuse, M.; Fujimoto, K. y Tsukita, S., "Claudin multigen family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands", *Proc. Natl. Acad. Sci,* EE.UU., **96:** 511-516, 1999a.

———— ; Sasaki, H.; Fujimoto, K.; Furuse, M. y Tsukita, S., "Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis", *J. Cell Biol.,* **145:** 579-588, 1999b.

Muller, B.M.; Kistner, U.; Veh, R.W.; Cases-Langhoff, C.; Becker, B.; Gundelfinger, E.D. y Garner, C.C., "Molecular characterization and spatial distribution of SAP97 a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and the Drosophila discs-large tumor suppresor protein", *J. Neuroscie.,* **15:** 2354-2366, 1995.

Muto, S.; Sato, Y.; Umeki, Y.; Yoshida, K.; Yoshioka, T.; Nishikawa, Y.; Nakamura, T.; Mori, M.; Koyama, K. y Enomoto, K., "HGF/SF-induced spreading of MDCK cells correlates with dissapearance of barmotin/7H6, a tight junction-associated protein, from the cell membrane", *Cell Biol. Int.,* **24:** 439-446, 2000.

Orsulic, S.; Huber, O.; Aberle, H.; Arnold, S. y Kemler, R., "E-cadherin binding prevents β-catenin nuclear localization and β-catenin/LEF-1 mediated transactivation", *J. Cell Sci.*, **112:** 1237-1245, 1999.

Overduin, M.; Harvey, T.S.; Bagby, S.; Tong, K.I.; Yau, P.; Takeichi, M. e Ikura, M., "Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion", *Science,* **267:** 386-389, 1995.

Pawson, T., "Protein modules and signaling networks", *Nature,* **373:** 573-580, 1995.

Pereira, L.; Maidji, E.; Tugizov, S. y Jones, T., "Deletion mutants in human cytomegalovirus glycoprotein US9 are impaired in cell-cell transmission and in altering tight junctions of polarized human retinal pigment epithelial cells", *Scand. J. Infect. Dis.,* Suppl., **99:** 82-87, 1995.

Pérez-Moreno, M.; Ávila, A.; Islas, S.; Sánchez, S. y González-Mariscal, L., "Vinculin but not α-actinin is a target of PKC phosphorylation during junctional assembly induced by calcium", *J. Cell Scie.,* **111:** 3563-3571, 1998.

Rajasekaran, A.K.; Hojo, M.; Huima, T. y Rodríguez-Boulan, E., "Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions", *J. Cell Biol.,* **132:** 451-463, 1996.

Rao, A.; Harms, K.K. y Craig, A.M., "Neuroligation: building synapses around the neurexin-neuroligin link", *Nat. Neurosci.,* **3:** 747-749, 2000.

Reynolds A.; Daniel, J.M.; Mo, Y.Y.; Wu, J. y Zhang, Z., "The novel catenin $p120^{cas}$ binds classical cadherins and induces an unusual morphological phenotype in NIH3T3 fibroblasts", *Exp. Cell Res.,* **225:** 328-337, 1996.

Saitou, M.; Furuse, M. y Tsukita, Sh., "Characterization of mammalian occludin in various epithelial tissues", *Mol. Biol. Cell,* Supl., **7:** 606a, 1996.

Sakakibara, A.; Furuse, M. y Tsukita, Sh., "Elevated phosphorylation of occludin during tight junction formation in epithelial cells", *Mol. Biol. Cell*, Supl., **7:** 606a, 1996.

Salomon, D.; Sacco, P.; Roy, S.; Simcha, I.; Johnson, K.; Wheelock, M. y Ben-Ze'ev, A., "Regulation of β-catenin levels and localization by overexpression of plakoglobin and inhibition of the ubiquitin-proteosome system", *J. Cell Biol.,* **130:** 1325-1335, 1997.

Sanson, B.; White, P. y Vincent, J.P., "Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in Drosophila", *Nature,* **383:** 627-630, 1996.

Schneeberger, E., “Tight junctions: their modulation under physiological and pathological states”, en *Molecular mechanisms of epithelial cell junctions: from Development to Disease,* Citi, S., ed., R.G. Landes Biomedical Publishers, Austin, Texas, 123-140, 1994.

Shapiro, L.; Fannon, A.M.; Kwong, P.D.; Thompson, A.; Lehmann, M.S.; Grübel, G.; Legand, J.F.; Als-Nielsen, J.; Colman, D.R. y Hendrickson, W.A., “Structural basis for cell-cell adhesion by cadherins”, *Nature,* **374:** 327-336, 1995.

Sheth, B.; Fesenko, I.; Collins, J.E.; Moran, B.; Wild, A.E.; Anderson, J.M. y Fleming, T.P., “Tight junction assembly during mouse blastocyst formation is regulated by late expression of ZO-1 α^+ isoform”, *Develop,* **124:** 2027-2037, 1997.

———— ; Fontaine, J.; Ponza, E.; McCallum, A.; Page, A.; Citi, S.; Louvard, D.; Zahraoui, A. y Fleming, T.P., “Differentiation of the epithelial apical junctional complex during mouse pre-implantation development: a role for rab13 in the early maturation of the tight junction”, *Mech. Develop.,* **97:** 93-104, 2000.

Simon, D.B.; Lu, Y.; Choate, K.A.; Velazquez, H.; Al-Sabban, E.; Praga, M.; Casari, G.; Bettinelli, A.; Colussi, G.; Rodriguez-Soriano, J.; McCredie, D.; Milford, D.; Sanjad, S. y Lifton, R.P., “Paracellin-1 a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption”, *Science,* **285:** 103-106, 1999.

Simske, J.S.; Kaech, S.M.; Harp, S.A. y Kim, S.K., “Let-23 receptor localization by the cell junction protein Lin-7 during C elegans vulval induction”, *Cell,* **84:** 195-204, 1996.

Songyang, Z.; Fanning, A.S.; Fu, C.; Xu, J.; Marfatia, S.M.; Chishti, A.H.; Crompton, A.; Chan, A.C.; Anderson, J.M. y Cantley, L.C., “Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains”, *Science,* **275:** 73-77, 1997.

Stevenson, B.R.; Haskims, J.; Hibbard, J.; Tamber, M. y Weber, D., “P130 is homologous to ZO-1 and ZO-2 and is a novel member of the MAGUK family of proteins”, *Mol. Biol. Cell,* Supl., **7:** 605a, 1996.

———— , Siliciano, J.D.; Mooseker, M.S. y Goodenough, D.A., “Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia”, *J. Cell Biol.,* **103:** 755-766, 1986.

Sugita, S.; Khvochtev, M. y Sudhof, T.C., “Neurexins are functional alpha-latrotoxin receptors”, *Neuron,* **22:** 489-496, 1999.

Sunshine, C.; Francis, S. y Kirk, K.L., “Rab 3b regulates ZO-1 targeting and actin organization in PC12 neuroendocrine cells”, *Exp. Cell Res.,* **257:** 1-10, 2000.

Takahashi, K.; Matsuo, T.; Katsube, T.; Ueda, R. y Yamamoto, D., “Direct binding between two PDZ domain proteins Canoe and ZO-1 and their roles in regulation of the Jun N-terminal kinase pathway in Drosophila morphogenesis”, *Mech. Develop.,* **78:** 97-111, 1998.

Takahisa, M.; Togashi, S.; Suzuki, T.; Kobayashi, M.; Murayama, A.; Kondo, K.; Miyake, T. y Ueda, R., “The *Drosophila tamou* gene a component of the activating pathways of extramacrochaetae expression, encodes a protein homologous to mammalian cell-cell junction-associated protein ZO-1”, *Genes & Develop.,* **10:** 1783-1795, 1996.

Takeda, H. y Tsukita, S., “Effects of tyrosine phosphorylation on tight junctions in temperature-sensitive v-src-transfected MDCK cells”, *Cell Struct. Funct.,* **20:** 387-393, 1995.

Tsukamoto, T. y Nigam, S.K., “Tight junction proteins form large complexes and associate with the cytoskeleton in an ATP depletion model for reversible junction assembly”, *J. Biol. Chem.,* **272:** 16133-16139, 1997.

Underwood, J.L.; Murphy, C.G.; Chen, J.; Franse-Carman, L.; Wood, I.; Epstein, D.L. y Alvarado, J.A., "Glucocorticoids regulate transendothelial fluid flow resistance and formation of intercellular junctions", *Am. J. Physiol.,* **277:** C330-C342, 1999.

Watabe, M.; Nagafuchi, A.; Tsukita S. y Takeichi, M., "Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma cell line", *J. Cell Biol.,* **127:** 247-256, 1994.

Weber, E.; Berta, G.; Tousson, A.; St. John, P.; Gree, M.W.; Gopalokrishnam, U.; Jilling, T.; Sorcher, E.J.; Elton, T.S.; R. Abrahamson, D.R. y Kirk, K.L., "Expression and polarization of a Rab3 isoform in ephitelial cells", *J. Cell. Biol.,* **125:** 583-594, 1994.

Willot, E.; Balda, M.S.; Heintzelman, M.; Jameson, B. y Anderson, J.M., "Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1", *Am. J. Physiol.,* **262:** C119-C1124, 1992.

Wittchen, E.S.; Haskins, J. y Stevenson, B.R., "Protein interactions at the tight junction: actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3", *J. Biol. Chem.,* **274:** 35179-35185, 1999.

Wodarz, A. y Nusse, R., "Mechanisms of Wnt signaling in development", *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.,* **14:** 59-88, 1998.

Woods, D.F. y Bryant, P.J., "The discs large tumor supressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions", *Cell,* **66:** 451-464, 1991.

Yamada, Y.; Chochi, Y.; Ko, J. A.; Sobue, K.; Inui, M., "Activation of channel activity of the NMDA receptor-PSD-95 complex by guanylate kinase-associated protein (GKAP)", *FEBS Lett.,* **458:** 295-298, 1999.

Yamamoto, T.; Harada, N.; Kano, K.; Taya, S.; Canaani, E.; Matsuura, Y.; Mizoguchi, A.; Ide, C.; Kaibuchi, K., "The ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells", *J. Cell Biol.,* **139:** 785-795, 1997.

———— ; Harada, N.; Kawano, Y.; Taya, S. y Kaibuchi, K., "*In vivo* interaction of AF-6 with activated ras and ZO-1", *Biochem. Biophys. Res. Comm.,* **259:** 103-107, 1999.

Youakim, A. y Ahdieh, M., "Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin", *Am. J. Physiol.,* **39:** G1279-G1288, 1999.

Zahraoui, A.; Joberty, G.; Arpin, M.; Fontaine, J.J.; Hellio, A.; Tavitian, A. y Louvard, D., "A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with the tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells", *J. Cell Biol.,* **124:** 101-115, 1994.

CAPÍTULO 9

EL CITOESQUELETO

Gloria Benítez King ■ Arturo González Robles
Isaura Meza Gómez-Palacio



Resumen

El citoesqueleto es un conjunto de componentes fibrilares presentes en la matriz citoplásmica de células eucariónticas. Estructuralmente, se han definido los siguientes elementos: microfilamentos, microtúbulos, filamentos intermedios y una delicada estructura reticular denominada red microtrabecular.

Los microfilamentos constituidos por actina tienen un diámetro de 5 a 7 nanómetros (nm) e interaccionan con miosina y muchas otras proteínas en el citoplasma y en la membrana plasmática; son sensibles a drogas como la faloidina y la citocalasina las cuales alteran su distribución y grado de polimerización y están involucrados en procesos de motilidad celular y movimientos intracelulares. Los microfilamentos constituidos por la miosina convencional o miosina II tienen un diámetro variable de alrededor de 15 nm y participan en fenómenos de contracción como es el caso de los sarcómeros de distintos tipos de músculos y del anillo contráctil que se forma durante la citocinesis y en la zona basolateral de las células epiteliales. Las miosinas I o no convencionales no forman filamentos y se asocian a la actina y a las vesículas o membranas celulares, por lo que su papel está más bien asociado al transporte.

Los microfilamentos constituidos por actina tienen un diámetro de 5 a 7 nanómetros (nm).

Los microtúbulos son estructuras tubulares constituidas por unidades de tubulina, con diámetro promedio de 25 nm. Los microtúbulos intervienen en diversas funciones tales como el transporte intracelular, el movimiento de cilios y flagelos y el movimiento de cromosomas; son sensibles a temperatura, presión y drogas como colchicina, vinblastina y taxol. Para polimerizarse y funcionar, se asocian a proteínas como las llamadas MAPs (proteínas asociadas a microtúbulos), Tau y la dinaína.

Los microtúbulos son estructuras tubulares constituidas por unidades de tubulina, con diámetro promedio de 25 nm.

Los filamentos intermedios tienen un diámetro de 8 a 10 nm, son bioquímicamente heterogéneos y están formados por diversas proteínas como queratina, vimentina, desmina, etc. Son muy frecuentes en células sujetas a tensión mecánica y en axones de células nerviosas, y son los componentes más estables del citoesqueleto. No se conocen drogas que los despolimeri-

Los filamentos intermedios tienen un diámetro de 8 a 10 nm, y están formados por diversas proteínas como queratina, vimentina, desmina, etc.

cen aunque se desorganizan al despolimerizarse los microtúbulos. Se piensa que la fosforilación en los residuos de serina de las proteínas que forman a los filamentos intermedios está relacionada con funciones específicas.

Las microtrabéculas forman parte de la "materia básica" del citoplasma, donde forman una fina red microtrabecular. Se supone que sirven de soporte e interconexión a diversos organelos del citoplasma. Se sugiere que están formadas por una proteína semejante a la actina, pero se desconoce su composición molecular.

Introducción

El citoesqueleto es un grupo complejo de estructuras citoplásmicas constituidas por proteínas filamentosas.

El término citoesqueleto fue introducido en años recientes para denominar a un grupo complejo de estructuras citoplásmicas constituidas por proteínas filamentosas. La mayoría de las células eucariónticas tiene una forma definida y presenta un alto grado de organización interna, pero, a la vez, puede cambiar de forma, producir movimientos en su interior a fin de redistribuir diferentes organelos, y en ocasiones migrar de un sitio a otro. Generalmente se acepta que la forma, organización interna y movimiento celular dependen directamente de los elementos del citoesqueleto, que constituyen, por así decirlo, los "huesos y músculos" de las células. Debe considerarse, sin embargo, que el citoesqueleto no es sólo un conjunto de estructuras estáticas encargadas de proporcionar soporte a la célula, sino que constituye un complejo estructural dinámico el cual, según el caso, puede actuar como un elemento de soporte o bien experimentar cambios rápidos en estructura y disposición. Esto se consigue por las características de sus elementos, como veremos más adelante, ya que pueden ensamblarse y desensamblarse según los requerimientos funcionales de la célula.

Componentes del citoesqueleto

Los cuatro componentes principales que forman al citoesqueleto son los microfilamentos, los microtúbulos, los filamentos intermedios, y una fina red de microtrabéculas.

Utilizando las técnicas apropiadas para estudios ultraestructurales y moleculares, se han determinado cuatro componentes principales que forman al citoesqueleto: microfilamentos, microtúbulos, filamentos intermedios, y una fina red de microtrabéculas, todos ellos dispuestos en arreglos ordenados en la mayoría de las células animales y en algunas vegetales (figura 9-1a). Ciertos elementos del citoesqueleto, como es el caso de los microtúbulos, fueron ya observados por citólogos de fines del siglo XIX como estructuras fibrosas; pero la comprensión real de su estructura tuvo que esperar al advenimiento del microscopio electrónico y al refinamiento de técnicas para la fijación y el corte adecuado de los tejidos, la tinción negativa y la difracción de rayos X entre otras, así como a las técnicas empleadas en conjunto con la microscopia óptica como polarización e interferencia del haz de luz, microinyección y video-microscopia. Los microtúbulos, por ejemplo, se pudieron describir como tales en el citoplasma cuando se introdujo la fijación con glutaraldehído, en 1957.

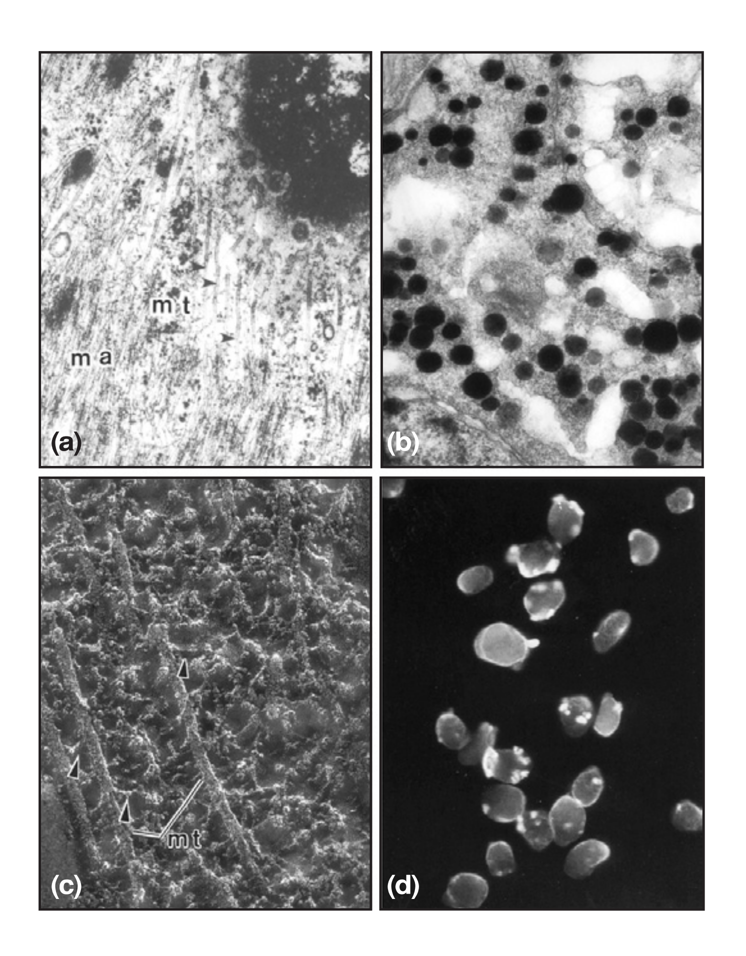


Figura 9-1. Componentes del citoesqueleto observados con diferentes métodos. **a)** Célula muscular lisa vista por microscopia electrónica de transmisión; el citoplasma tiene abundantes microfilamentos de actina (ma), orientados en relación al eje mayor de la célula. Cerca del núcleo y con la misma orientación, se observan numerosos microtúbulos (mt). X 80,000. **b)** Citoplasma de una célula de la retina de acocil observada en corte grueso por microscopia electrónica de alto voltaje. Los gránulos de pigmento se observan embebidos en la matriz citoplásmica fibrosa y conectados a ella. X 16,000. **c)** Microtúbulos de la red citoplásmica vistos por el método de congelamiento rápido. Se observa la conexión de los microtúbulos (mt) con los brazos de la nexina (puntos de flecha) o proteína motora que permite el movimiento de los gránulos de pigmento. X 118,000. **d)** Regiones corticales de intensa endocitosis en trofozoítos de *E. histolytica*, en donde la actina se acumula y puede identificarse por marcaje con faloidina fluorescente. X 4,000. Fotografías b y c, cortesía de E. Frixione.

Métodos de estudio

Hay dos metodologías clásicas para el estudio del citoesqueleto, que son la microscopia electrónica y la inmunofluorescencia. Las primeras observaciones de la estructura fina de los componentes del citoesqueleto se llevaron a cabo utilizando las técnicas convencionales de corte y contraste empleadas en microscopia electrónica, siendo posible observar claramente en el citoplasma de diversos tipos celulares finos filamentos o bien haces de los mismos, a menudo asociados con la membrana plasmática, así como estructuras tubulares. Se establecieron entonces las bases estructurales que diferencian a los filamentos de los túbulos. Se estableció también la estructura clásica de los flagelos y los cilios, en la cual los microtúbulos se asocian en pares para formar el axonema.

Una de las limitaciones que presenta la microscopia electrónica de transmisión es el escaso poder de penetración de los electrones en la muestra. Ésta debe ser sumamente delgada (del orden de 50 a 100 nm). Por ello, no es posible tener una imagen completa de la disposición tridimensional del citoesqueleto, ni de la manera en que se encuentran interrelacionados sus diversos elementos, por lo que se emplearon, en algunos casos, células completas o bien algunos de los componentes del

citoesqueleto aislados que se observaron, utilizando principalmente 2 métodos:

a) tinción negativa que permite observar sin necesidad de hacer cortes finos, estructuras particuladas y fibrosas, las cuales son colocadas sobre una rejilla de cobre provista de un soporte de plástico y cubierta con carbón. La rejilla se cubre con alguna solución de sales de metales pesados como son el acetato de uranilo o el ácido fosfotúngstico. Al observar estas preparaciones al microscopio electrónico, aparecen como objetos claros sobre un fondo oscuro, debido a que las macromoléculas que integran la muestra excluyen al metal y, por ello, los electrones pasan con mayor facilidad a través de ellas que en donde se encuentra éste; y
b) solubilización parcial de la membrana y extracción de la matriz citoplásmica con el empleo de detergentes no iónicos, los cuales eliminan a las proteínas solubles y a los fosfolípidos en la membrana plasmática y dejan como residuo una red de diferentes filamentos, que en su conjunto representan al citoesqueleto.

Con el desarrollo del microscopio electrónico de alto voltaje, se pudieron estudiar células completas y seleccionar áreas delgadas del cuerpo celular. Se tuvo así una visión más completa de la interrelación de diversos componentes del citoesqueleto entre sí y con otros organelos en el citoplasma. En la figura 9-1b podemos ver la relación de la matriz citoplásmica con gránulos de pigmento en las células reticulares del acocil. Un complemento a esta técnica de extracción consiste en congelar las células de una manera rápida empleando una placa de cobre enfriada con helio líquido a –269 °C permitiendo que el agua del citoplasma se elimine. De esta manera se descubren estructuras en relieve en el interior de la célula. Este método permite observar con nitidez y de una manera tridimensional los diversos elementos del citoesqueleto y las relaciones espaciales que éstos guardan entre sí (figura 9-1c). La estructura de la red terminal y el interior de las microvellosidades —ambas presentes en células epiteliales— se han determinado con este método, que también ha permitido establecer cómo se disponen las proteínas con actividad de ATPasas (hidrolasas del adenosin-trifosfato, llamado en adelante ATP), para formar estructuras semejantes a "brazos", a lo largo de los microtúbulos y de los microfilamentos que, de esta forma, adquieren la energía suficiente para moverse.

Sin embargo, fue la utilización de la inmunofluorescencia lo que ha permitido un avance impresionante en el estudio de la distribución de varios de los componentes del citoesqueleto. Esta metodología aprovecha una propiedad de estas proteínas que consiste en que su secuencia de aminoácidos es muy similar, posiblemente como resultado de haberse derivado de un gen común; por lo cual, los anticuerpos preparados contra una de estas proteínas dan reacción cruzada con la misma proteína, pero de diferente fuente. Por ejemplo, los anticuerpos contra actina o tubulina purificada de cerebro de mamífero reconocen específicamente otras actinas o tubulinas en todo tipo de células, tanto de eucariontes superiores como de organismos inferiores.

La técnica consiste en utilizar el anticuerpo específico contra la proteína que se quiere localizar. Las células, ya sea en cultivo o en el tejido, se fijan con formaldehído y se permeabilizan con acetona o metanol, para que el anticuerpo penetre al interior de la célula. El anticuerpo se une al antígeno que está en forma de estructura filamentosa o tubular, o a la proteína soluble que se encuentra en diferentes regiones del citoplasma. Las células se incuban con un segundo anticuerpo acoplado a un reactivo fluorescente (los más comunes son isotiocianato de fluoresceína y rodamina), dirigido a su vez contra las inmunoglobulinas del primer anticuerpo. Después de lavados prolongados con solución salina, para quitar el exceso de anticuerpos, las células pueden observarse en un microscopio equipado para fluorescencia.

Al incidir la luz ultravioleta de cierta longitud de onda sobre la preparación, el reactivo fluorescente emite una señal que es filtrada a través del microscopio y se recoge como una señal amplificada de las estructuras que forman el citoesqueleto a las que se han unido los dos anticuerpos. Esta amplificación permite seguir la distribución de los elementos del citoesqueleto, así como sus cambios en relación con funciones específicas. Usando esta misma metodología y anticuerpos monoclonales, es decir, anticuerpos dirigidos contra uno solo de los determinantes antigénicos o epítope de una molécula, se ha podido diferenciar entre diversos tipos de filamentos o túbulos que están formados por proteínas relacionadas entre sí pero no idénticas, las cuales ejecutan funciones específicas. Por ejemplo, con este tipo de anticuerpos se ha podido determinar que los filamentos intermedios cambian su conformación durante la mitosis, lo cual resulta en la exposición de epítopes específicos en la molécula que no están expuestos durante la interfase, y que diferentes tipos de tubulinas forman a los microtúbulos que se encuentran asociados a estructuras como el aparato de Golgi y el aparato mitótico.

Se han utilizado también anticuerpos marcados con fluorescencia para estudiar en forma indirecta la función de los antígenos contra los que están dirigidos. Así, al microinyectar a una célula en mitosis con anticuerpos contra actina se ha impedido la citocinesis, indicando la participación de la actina en este proceso. Igualmente, se ha localizado miosina en el aparato mitótico, al inyectar un anticuerpo antimiosina que impide que la célula se divida. Los anticuerpos monoclonales contra proteínas de filamentos intermedios causan una disrupción total de la estructura celular, si son microinyectados en células en cultivo.

La microinyección de macromoléculas a células en cultivo es una metodología que ha permitido un avance importante en el conocimiento de las funciones del citoesqueleto. No sólo se han inyectado los anticuerpos, sino también actina fluorescente en varios tipos de células para investigar la incorporación de actina soluble a proteína filamentosa. En estos experimentos se ha podido estudiar la distribución de esta molécula, en los momentos en que se producen pseudópodos y otras proyecciones del citoplasma, dando una idea completa de cómo se llevan a cabo estos fenómenos de motilidad celular. Recientemente, se han podido introducir a varios tipos de células, secuencias de RNA mensajeros antisentido, es decir, los transcritos

complementarios al transcrito natural de un gen. El antisentido de miosina, por ejemplo, introducido a la forma amiboidea de *Dictyostelium* inhibe la transcripción eficiente del gen único de miosina que tienen estas células. Como resultado, las amibas no tienen suficiente miosina, de modo que estas células transfectadas pueden moverse y dividirse con dificultad y son deficientes en fagocitosis; ello indica que la miosina participa en estos procesos.

Otra molécula que se ha utilizado en el estudio del citoesqueleto es un derivado de la faloidina (falacidina). La falacidina fue aislada del hongo venenoso *Amanita phalloides* y se une específicamente a filamentos de actina. La falacidina fluorescente se une a la actina de las células permeabilizadas y puede entonces visualizarse en el microscopio de fluorescencia el patrón de filamentos de actina y estudiar su distribución, sin tener que recurrir a la obtención de un anticuerpo contra actina.

La utilización de cámaras de televisión que registran señales luminosas de muy baja intensidad, y de computadoras para procesar las imágenes de fluorescencia obtenidas de las células marcadas con moléculas fluorescentes, ha permitido un avance muy grande en la cuantificación de las proteínas del citoesqueleto en células individuales y en estudios de interacción con otras proteínas. Igualmente, el uso de la microscopia confocal ha permitido la observación de planos específicos en la célula, y separar perfectamente la fluorescencia de una estructura del resto de los componentes en la célula. Por otro lado, la obtención de proteínas del citoesqueleto purificadas y marcadas *in vitro* con reactivos fluorescentes ha facilitado el seguimiento de cinéticas de polimerización de estas proteínas, utilizando fluorespectrofotometría. Este tipo de mediciones permiten analizar las diferentes etapas de ensamble, así como el desensamble y nucleación de los monómeros que forman un filamento o un túbulo. De la misma manera, se puede analizar la interacción de otras proteínas con los monómeros y, por tanto, tener idea de cómo se llevan a cabo estos procesos dentro de las células.

Otra técnica utilizada recientemente en el estudio del citoesqueleto es la construcción de proteínas mutadas o quiméricas. Éstas están formadas por secuencias de aminoácidos modificadas, o por diferentes combinaciones de secuencias pertenecientes a dos o más proteínas del citoesqueleto. Para poder llegar a esto, primero se clonan los genes de las proteínas en estudio, y, por medio de reacciones enzimáticas, se hacen las diferentes construcciones. Posteriormente, estas moléculas se transfectan a las células receptoras, en donde se amplifican para tener un número suficiente de copias del gen modificado. Esto puede hacerse en células en cultivo o en células embrionarias, durante la etapa de blástula, para obtener un animal transgénico. Esta técnica permite estudiar la expresión de genes específicos en el animal adulto, durante las diferentes etapas de la diferenciación celular, o en las células en cultivo sujetas a diversos estímulos o a inhibidores de alguna actividad celular específica.

Por medio de estas técnicas, ha sido posible sobreexpresar proteínas del citoesqueleto y así estudiar en qué funciones participan. Por ejemplo, la sobrexpresión del gen de vimentina en ratones transgénicos cau-

sa una diferenciación anormal de las fibras lenticulares y los animales desarrollan cataratas. En otros experimentos, se ha demostrado que los ratones que sobreexpresan transgenes que codifican a las proteínas de neurofilamentos desarrollan atrofia neurológica, acompañada de una acumulación anormal de neurofilamentos. En las células transfectadas con genes que codifican a las proteínas motoras (cinesina y dinaína) se ha podido dilucidar el papel que tienen estas proteínas en el movimiento anterógrado y retrógrado para transportar diferentes organelos. Por último, con este tipo de estrategia, se ha podido definir el papel de los filamentos intermedios en el metabolismo celular y durante la transformación maligna.



Microfilamentos

Los filamentos se encuentran presentes en la mayoría de las células eucariónticas tanto animales como vegetales; en algunas células son abundantes, como en células musculares, nerviosas y epiteliales, particularmente del epitelio escamoso estratificado. Los elementos fibrosos intracelulares pueden existir en forma individual o agruparse para formar estructuras más complejas que podrían reunirse en tres categorías, según su diámetro: 1) filamentos (5 a 15 nm de diámetro); 2) fibrillas (haces de filamentos de aproximadamente 0.2 μm de diámetro); y 3) fibras constituidas por haces de fibrillas, las cuales se observan fácilmente con el microscopio de luz, aun a bajos aumentos.

Los filamentos se encuentran presentes en la mayoría de las células eucariónticas animales y vegetales.

Filamentos delgados

Estos microfilamentos tienen un diámetro de 5 a 7 nm. Están formados de un solo polipéptido, llamado actina. Esta proteína fue descrita primero en el músculo esquelético, pero se encuentra también en las células no musculares. Tiene un peso molecular de 41,800 daltones y es una proteína globular (G-actina). Tiene asociada una molécula de Ca^{2+} que estabiliza la conformación globular y una molécula de ATP, cuyo fosfato terminal se hidroliza cuando la actina G polimeriza y se convierte en actina F, que forma el microfilamento. Esta polimerización se obtiene elevando las concentraciones de sal en la solución de actina G (figura 9-2a).

Los filamentos de actina vistos al microscopio electrónico, están constituidos por dos cadenas de actina globular de 4 nm de diámetro, enrolladas formando una hélice, cuyos extremos, de conformación molecular diferente le confieren polaridad al filamento, razón por la cual el filamento crece añadiendo monómeros únicamente a uno de los extremos. Esta polaridad se detecta en la forma en que interacciona un filamento de actina con las moléculas de miosina. Al interaccionar la actina con la cadena pesada de la miosina se forman estructuras parecidas a puntas de flecha, vistas por tinción negativa en la figura 9-2b. Esta interacción requiere de la unión de ATP a la cabeza de miosina y su hidrólisis por la misma miosina que tiene acti-

Figura 9-2. Organización de filamentos de actina. **a)** Filamentos de actina polimerizados *in vitro*. X 10,000. **b)** Filamentos de actina decorados con meromiosina pesada (fracción de la miosina que tiene actividad de adenosin trifosfatasa) que muestran la característica figura de puntas de flecha con orientación definida en un solo sentido del filamento de actina al que se unen (flechas). X 115,000. **c)** Fibras de tensión de actina formadas por haces de microfilamentos en fibroblastos 3T3 y vistos por tinción de fluorescencia utilizando faloidina rodaminada. X 2,400. **d)** Microvellosidades del epitelio intestinal. Al centro de cada microvellosidad se observan grupos de filamentos de actina (puntas de flecha). En la región apical, los filamentos se insertan en una capa electrodensa de material amorfo. X 80,000.

vidad de ATPasa. Los cambios de conformación de la miosina por estas actividades permite que las cabezas se desplacen sobre los filamentos de actina y haya movimiento.

En el músculo esquelético, la actina es el principal constituyente de los llamados filamentos finos presentes en los sarcómeros.

En el músculo esquelético, la actina es el principal constituyente de los llamados filamentos finos presentes en los sarcómeros. En organismos unicelulares y en células no musculares, los filamentos de actina se organizan para formar redes finas y haces o fibras de tensión, que están involucradas en la motilidad y en el mantenimiento de la morfología celular (figura 9-2c). Muchas de las proyecciones en la superficie celular como filopodios, microespículas, etc., son estructuras dinámicas que se forman y se retraen con gran rapidez, a través de la polimerización y despolimerización de la actina. En las células amiboideas, la actina no forma filamentos largos y aparece como concentraciones fibrogranulares difusas en la región cortical (figura 9-1d). En estructuras estables, como las microvellosidades de los epitelios hay una red de microfilamentos de actina mantenida por interacción de esta proteína con otras proteínas como la fimbrina y la vellosina (figura 9-2d). En la mayoría de las células, tanto las que forman parte de un tejido como las que se desplazan de manera individual, los filamentos de actina se organizan en una red intrincada, entrelazada con proteínas que se asocian a los filamentos de actina y les confieren estabilidad. Esta red, situada por deba-

jo de la membrana plasmática se conoce como corteza celular y le da soporte mecánico a la superficie de la célula. Recientemente, se ha encontrado que esta corteza sostiene en su sitio a varios de los componentes moleculares que participan en la transducción de señales que se inician en la membrana plasmática. Los diversos tipos de actinas, en los diferentes tipos de células, son producto de la transcripción de genes diferentes, pero relacionados entre sí y cuyo número de copias es también variable. Se han identificado hasta ahora 6 genes de actina en diversas células estudiadas. Estas actinas son funcionalmente equivalentes, es decir, forman microfilamentos heterogéneos con función idéntica.

Filamentos gruesos

Están formados por miosina, descrita también inicialmente en el músculo esquelético, en donde, junto con la actina, constituye los sarcómeros. Estos filamentos gruesos tienen un diámetro de 15 nm (figura 9-3). La miosina ha variado considerablemente en la evolución, a diferencia de tubulina y actina que son proteínas con una secuencia de aminoácidos muy conservada. Actualmente, se conocen 2 tipos de miosinas, la I y la II.

La miosina II o miosina convencional es soluble a altas concentraciones de sal. Está formada por 6 polipéptidos, 2 cadenas pesadas de 200,000 daltones y 2 pares de ligeras de 16,000 y 20,000 daltones. Las cadenas pesadas forman fibras con extremos globulares o cabezas que se asocian a los filamentos de actina para producir la contracción del sarcómero. Cuando la actina se asocia a la miosina *in vitro* se activa la enzima ATPasa de la miosina, independientemente de la presencia de iones Ca^{2+}. Sin embargo, en el músculo esquelético la actividad de la ATPasa es dependiente del calcio y es regulada por la troponina y la tropomiosina. Como se explicó anteriormente, la interacción de la miosina con la actina está regulada por los cambios en la conformación de la miosina y depende de la hidrólisis de

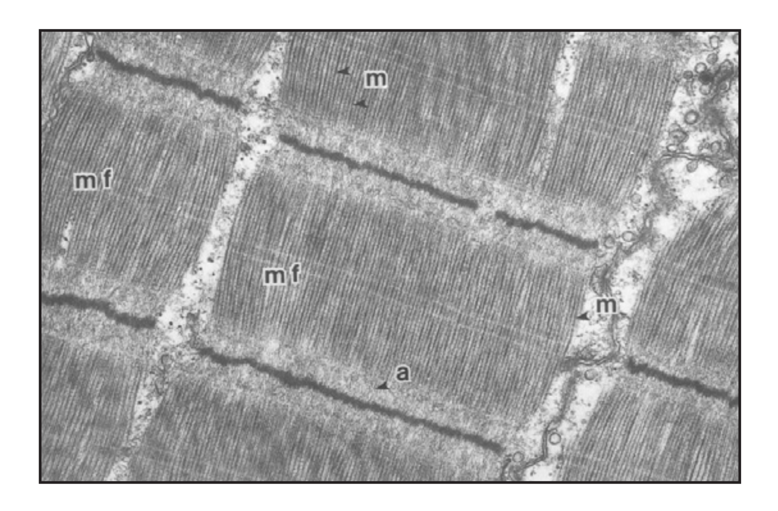


Figura 9-3. Célula muscular cardiaca representativa de un citoesqueleto altamente organizado. Se muestran varias miofibrillas (mf) con su característico patrón de estriación; en ellas se observan claramente filamentos gruesos de miosina (m) y filamentos delgados de actina (a). X 25,000.

La miosina se considera un motor celular por su capacidad para moverse e inducir desplazamiento de otros elementos del citoesqueleto con los que se asocia.

ATP. La miosina se considera un motor celular por su capacidad para moverse e inducir desplazamiento de otros elementos del citoesqueleto con los que se asocia. En las células no musculares, la miosina II existe en forma de filamentos aislados.

Las miosinas I son moléculas más pequeñas que la miosina II, son ligeramente diferentes entre sí, pero, en forma general, se puede decir que están constituidas por una cadena pesada de 120,000 a 140,000 daltones, y, dependiendo de la forma de miosina de que se trate, tienen asociadas 1 o 2 cadenas ligeras de aproximadamente 15,000 a 30,000 daltones. En algunas de estas miosinas, las cadenas ligeras son moléculas de calmodulina. Estas miosinas, que se descubrieron recientemente, tienen un sitio de unión para la actina y uno de unión a la membrana plasmática. Por esta razón, se ha pensado que las miosinas I, también llamadas miosinas no convencionales, participan en el transporte de vesículas a los diferentes dominios de la membrana plasmática. La activación de la miosina en las células no musculares no depende de impulsos nerviosos, sino que puede activarse por niveles de AMPc (adenosin-monofosfato cíclico) y por hormonas, a través de mecanismos de señalización que liberan Ca^{2+} de reservorios citoplásmaticos al citosol. Además, en las células no musculares, la contracción depende de la fosforilación de la miosina por mecanismos dependientes de calcio y una enzima cinasa específica. Los mecanismos de regulación son distintos para cada tipo de célula.

Filamentos intermedios

La microscopia electrónica ha permitido observar en la matriz citoplásmica de las células eucariontes, filamentos con diámetro de 8 a 10 nm, que es un tamaño intermedio entre los microtúbulos y los microfilamentos; de ahí que se les denominara filamentos intermedios o filamentos de 10 nm. Estas estructuras del citoesqueleto están constituidas por una superfamilia heterogénea de cuando menos 50 diferentes proteínas que tienen pesos moleculares tan variados que van de 40,000 a 200,000 daltones. La distribución, composición y función de estos filamentos han sido ampliamente investigadas en años recientes, en gran variedad de células. Algunos de ellos han recibido su nombre de acuerdo con la célula de origen y se han clasificado en seis tipos diferentes. Los tipos I y II están constituidos por queratinas básicas y acídicas, respectivamente, y se expresan en células epiteliales. Los filamentos intermedios tipo III están constituidos por vimentina, desmina, la proteína acídica fibrilar y la periferina. Cada una de estas proteínas constituye los filamentos intermedios en células de origen mesenquimatoso, muscular, de la glía y en las células nerviosas periféricas, respectivamente. La clase IV de filamentos intermedios está constituida por las proteínas que forman a los neurofilamentos (NF-L, NF-M, y NF-H) y por la α internexina. La clase V de filamentos intermedios comprende las láminas nucleares A, B y C. Por último, los filamentos intermedios del grupo VI, están formados por la nestina que se expresa en las células neuroendoteliales (figura 9-4).



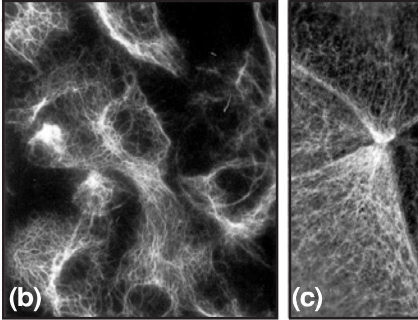


Figura 9-4. Organización de filamentos intermedios. **a)** Corte transversal de un axón mielínico de mamífero con abundantes filamentos intermedios (neurofilamentos nf) y algunos microtúbulos (neurotúbulos nt). X 80,000. **b)** Células de la línea MDCK, en donde se observa la malla formada por filamentos de queratina vista por inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo específico. X 1,600. **c)** Sitio de unión de las membranas de 2 células epiteliales (MDCK) en donde se observa la aposición de los filamentos intermedios asociados a los desmosomas que se forman en las membranas de estas células, cuando entran en contacto. X 1,600.

En una sola célula pueden coexistir diferentes tipos de filamentos intermedios. También pueden ser dirigidos a compartimentos subcelulares específicos, debido a que las proteínas de los filamentos intermedios tienen determinantes en su estructura primaria o a que son fosforiladas en residuos de aminoácidos específicos. Tanto la coexistencia de los filamentos intermedios en una sola célula, como su segregación a diferentes compartimentos subcelulares, ha sugerido que los diferentes tipos de filamentos intermedios tienen funciones selectivas.

Durante muchos años, se consideró que la función de los filamentos intermedios dentro de la célula era mecánica, es decir, como integradores del espacio intracelular. Sin embargo, cada vez se acumula más evidencia que indica que los filamentos intermedios tienen un papel importante para la fisiología de la célula. Algunas de las funciones mecánicas de los filamentos intermedios son, principalmente, la de dar soporte a diversos componentes celulares, la modificación de la forma de las células, o bien como elementos clave en la organización de la matriz citoplasmática. Una clara asociación de estos filamentos con la membrana plasmática se realiza en los desmosomas membranales, localizados principalmente en las células epiteliales. En el músculo esquelético se supone que mantienen a las miofibrillas adyacentes en registro uniendo los bordes de los discos Z. Actualmente, se sabe que los filamentos intermedios formados por queratinas tienen un papel protec-

tor en la piel y en los epitelios que cubren la pared intestinal y bronquial. Otras evidencias indican que los filamentos intermedios se requieren en diferentes etapas de la embriogénesis, en la organización nuclear, durante la replicación del DNA, para el ensamble de la envoltura nuclear y para regular el calibre axonal. También participan en el transporte del colesterol, así como en la proliferación de las células y en los fenómenos de migración celular.

Los filamentos intermedios son los componentes más estables del citoesqueleto y también los más insolubles.

Los filamentos intermedios son los componentes más estables del citoesqueleto y también los más insolubles. Cuando el citoplasma de las células se extrae con detergentes no iónicos, vistos al microscopio electrónico, estos filamentos se observan como hileras de moléculas poco organizadas, rectas o ligeramente curvas, aisladas o formando haces laxos o compactos. La dinámica y el mecanismo por el cual se ensamblan los filamentos intermedios no se conocen con exactitud. Sin embargo, todas las proteínas de los filamentos intermedios están constituidas por una región central de alrededor de 310 aminoácidos, que forman una estructura de hélice α, que se interrumpe en tres sitios diferentes. Además, cada una de las proteínas de los filamentos intermedios tienen un dominio amino-terminal y otro carboxilo-terminal, que es variable en su longitud y secuencia de aminoácidos.

Los filamentos intermedios se ensamblan formando dímeros superhelicoidales.

Los filamentos intermedios se ensamblan formando dímeros superhelicoidales, con las regiones helicoidales alineadas en paralelo. La alineación de dos dímeros (4 cadenas polipeptídicas), constituye protofilamentos de 48 nm por 3 nm. Estos protofilamentos se asocian de manera traslapada para formar filamentos largos, configurados por 8 protofilamentos de 32 cadenas polipeptídicas. El ensamble de los filamentos intermedios se controla a través de la fosforilación de las proteínas que los constituyen. Por ejemplo, la fosforilación de la vimentina ensamblada en filamentos causa la ruptura de los mismos. Otro mecanismo de control propuesto es la fragmentación de los filamentos intermedios por proteasas específicas activadas por calcio. También existen proteínas asociadas a los filamentos intermedios que modelan su ensamblaje. Entre éstas, están la epinemina, presente en células de origen mesenquimatoso; las filagrinas, presentes en las células de la epidermis; la filensina, presente en las células lenticulares; y por último, la paranemina y la sinemina, presentes en las células musculares y de origen fibroblástico.

Las proteínas de los filamentos intermedios son codificadas por genes diferentes.

Las proteínas de los filamentos intermedios son codificadas por genes diferentes, pero conservan secuencias similares en los extremos 5' y 3', que dan como resultado la conservación de la secuencia de aminoácidos en los extremos de estas proteínas.

Microtúbulos

En 1963, Slautterback propuso el término de microtúbulos para describir a un tipo de organelos citoplásmicos que en la actualidad han sido identificados como componentes casi universales del citoplasma de células de eucariontes, tanto animales como vegetales. Se definen como estructuras

cilíndricas semirrígidas, alargadas, con diámetro uniforme en toda su longitud y aparentemente no bifurcadas. El estudio detallado de su estructura revela que están constituidos, generalmente, por 13 subunidades globulares, las que integran una pared de 5 nm de espesor; cada túbulo tiene un diámetro promedio de 24 nm con un centro de menor densidad de aproximadamente 15 nm. Los microtúbulos se han aislado de diversos órganos, siendo el tejido nervioso una de las principales fuentes de obtención, dado el gran número de microtúbulos presente en los axones de células nerviosas. Químicamente, los microtúbulos están formados por una proteína dimérica llamada tubulina, de aproximadamente 120,000 daltones, y cada dímero está formado, a su vez, por dos polipéptidos denominados alfa tubulina y beta tubulina. Cuando las moléculas de tubulina se ensamblan para formar a los microtúbulos, constituyen los llamados protofilamentos de tubulina, los cuales se disponen de manera escalonada en hileras formadas con la molécula de alfa tubulina de un dímero, alineada junto a la molécula de beta tubulina de la siguiente hilera (figura 9-5a). Varias isoformas de las tubulinas α y β se derivan de modificaciones postraduccionales de los aminoácidos tales como destirosinación o fosforilación. Subpoblaciones de tubulinas forman microtúbulos que, de acuerdo con su composición, participan en funciones específicas. Los microtúbulos destirosinados se encuentran, por ejemplo, asociados al aparato de Golgi.

Los microtúbulos están formados por una proteína dimérica llamada tubulina.

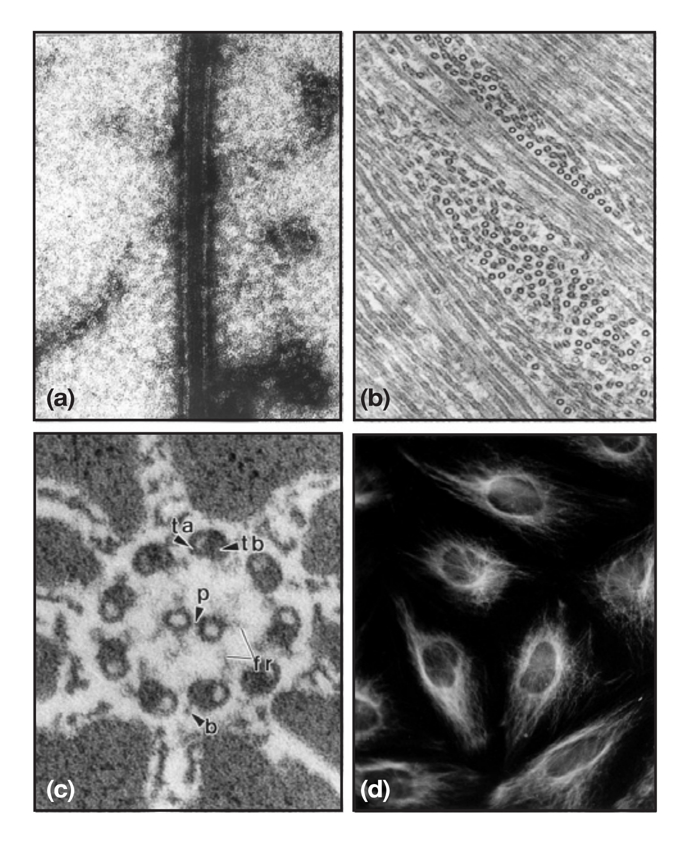


Figura 9-5. Organización de microtúbulos. **a)** Microtúbulo polimerizado *in vitro* y teñido por tinción negativa. X 300,000. **b)** Pastilla de microtúbulos polimerizados *in vitro* cortada y teñida para microscopia electrónica de transmisión. Se observa el corte longitudinal y transversal de los microtúbulos. X 80,000. **c)** Axonema de un flagelo de espermatozoide de cobayo en corte transversal. Los microtúbulos se disponen en un arreglo cilíndrico, de un par de microtúbulos centrales y nueve dobletes periféricos. Las principales figuras que lo integran son fr, fibras radiales; ta, túbulo A; tb, túbulo B; p, puente; b, brazos de dinaína. X 240,000. **d)** Inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo antitubulina que permite la localización de la red microtubular a partir de la región perinuclear, donde se organiza, hacia la periferia, y en donde los microtúbulos siguen el contorno celular. X 1,600.

Recientemente se identificó a una tercera forma de tubulina, a la que se llamó γ, que está asociada con el centrómero y que se ha especulado participa como el núcleo de polimerización de los monómeros α y β para formar a los microtúbulos.

Los microtúbulos no son organelos estables, ya que pueden ensamblarse y disgregarse rápidamente dependiendo de factores tanto físicos como químicos tales como temperatura, presión, concentración de iones de calcio, pH y alcaloides. Estas propiedades han permitido, como en el caso de la actina, seguir su proceso de polimerización *in vitro* y establecer los requerimientos para ensamblarlos. La polimerización requiere de la hidrólisis de GTP (guanosín trifosfato) de una concentración crítica del dímero de tubulina y de un centro organizador de microtúbulos, a partir del cual se produce la polimerización. El extremo cercano al centro organizador o centrosoma crece más lento y se conoce como (–). El que crece más rápido es el extremo distal o (+). Los microtúbulos polimerizados *in vitro* son idénticos a los que se encuentran en el citoplasma (figura 9-5b). En el citoplasma hay microtúbulos lábiles que son fácilmente desensamblados, como es el caso de las fibras que forman el huso de células en mitosis, que se afectan fácilmente por drogas como colchicina. Los microtúbulos en el citoplasma forman una red que se extiende en el cuerpo celular (figura 9-5c). Los microtúbulos estables que presentan mayor dificultad para ser desensamblados son, por ejemplo, los componentes de axostilos, flagelos, cilios y centriolos, en donde se agrupan en pares o tripletes (figura 9-5d).

Es difícil hacer una generalización acerca de una función particular de los microtúbulos además de su participación en la mitosis, por lo que se consideran como organelos versátiles que intervienen en diversos procesos celulares. Entre éstos pueden citarse el desarrollo y mantenimiento de la forma del cuerpo celular, la regulación en algunos casos del movimiento y disposición de organelos celulares como el aparato de Golgi, el transporte intracelular de moléculas, el desplazamiento de centriolos y cromosomas durante la mitosis, así como proporcionar la base estructural para mover cilios y flagelos. Igual que la actina, las tubulinas son proteínas conservadas, codificadas por genes similares cuyas copias están dispersas en el genoma. Se conocen varios tipos de proteínas α y β, cuya expresión es aparentemente regulada de forma independiente. Los microtúbulos también se asocian con otras proteínas que, al igual que la miosina, son motores celulares. La cinesina y la dinaína son proteínas con actividad de GTPasas y ATPasas que, al hidrolizar al GTP o al ATP, unido a los dímeros de tubulina, permiten el desplazamiento de otras moléculas sobre los microtúbulos, o el movimiento de los microtúbulos, en relación de unos con otros, como sucede durante el movimiento flagelar.

Red microtrabecular

Al estudiar células íntegras en cultivo, empleando microscopia electrónica de alto voltaje y fotografía estereoscópica, se ha observado la existencia de

una fina y compleja malla dispuesta de manera tridimensional en la matriz del citoplasma, que sujeta e interconecta los diversos organelos, membranosos y no membranosos presentes en el citoplasma. Las unidades que la forman se han denominado microtrabéculas; tienen un diámetro de 3 a 6 nm y en su conjunto forman una malla microtrabecular que se extiende por todo el citoplasma y termina por debajo de la membrana plasmática, tal vez unida a la misma. Actualmente, existe controversia sobre la naturaleza química de este componente del citoesqueleto y sobre su existencia real, aunque algunos estudios a nivel de microscopia electrónica, en los cuales se emplearon técnicas inmunoquímicas combinadas con la extracción de citoplasma, sugieren la posibilidad de que las microtrabéculas se encuentren formadas por una proteína semejante a la actina.



Drogas que actúan sobre los microtúbulos y microfilamentos, afectando su función

El aparato mitótico está involucrado en la distribución del material genético, y su funcionamiento preciso es requerido para la continuidad genética de cada individuo. Este mecanismo puede ser alterado por drogas que se unen específicamente a la tubulina, bloqueando el funcionamiento de los microtúbulos e induciendo la despolimerización del aparato mitótico; entre estas drogas están la colchicina, la vinblastina y la vincristina. Todas ellas se unen a los dímeros de tubulina causando un bloqueo del crecimiento del microtúbulo, cuando un dímero bloqueado se inserta en el extremo del túbulo que va creciendo. Como consecuencia de esto, el microtúbulo, que está en un estado de equilibrio dinámico, empieza a perder dímeros en el extremo opuesto y se despolimeriza. Por otro lado, el taxol, una droga aislada recientemente de la corteza de un árbol que crece en las regiones norte del Pacífico, produce el efecto contrario, induciendo la polimerización de tubulina y causando que toda la tubulina soluble se ensamble en los microtúbulos. Un efecto similar es producido por el agua deuterada (D_20) que cambia el equilibrio dinámico entre dímeros y microtúbulos y forma un aparato mitótico muy grande. Al afectarse el funcionamiento del aparato mitótico, se causa una mitosis anormal, con la consecuente distribución irregular de los cromosomas. En células en interfase, estas drogas causan un desarreglo de la red microtubular que afecta la forma y otras funciones de la célula.

> La colchicina, la vinblastina y la vincristina son drogas que se unen específicamente a la tubulina, bloqueando el funcionamiento de los microtúbulos e induciendo la despolimerización del aparato mitótico.

De la misma manera que hay drogas que afectan la estructura de los microtúbulos, existen drogas como las citocalasinas que afectan el grado de polimerización de la actina y tienen un efecto dilatorio en funciones celulares. Estas drogas se unen al extremo en crecimiento del microfilamento, previniendo la adición de moléculas de actina a este extremo, con la consecuente despolimerización del filamento. Otra droga, la faloidina, estabiliza a los microfilamentos inhibiendo su despolimerización. Esta droga no penetra en la mayoría de las células y debe ser inyectada para que tenga efecto. La faloidina afecta el movimiento amiboideo y la extensión sobre el sustrato de varias células en cultivo. La citocalasina no afecta a la mitosis, ni a la

> Las citocalasinas afectan el grado de polimerización de la actina.

contracción muscular, ya que ésta no implica polimerización-despolimerización de la actina. De igual forma, el efecto de la colchicina es específico para los microtúbulos. No se conocen drogas que afecten a los filamentos intermedios.



Polimerización *in vitro* de microtúbulos y microfilamentos

El paso inicial de la polimerización *in vitro* es la nucleación; se refiere al arreglo de dos o más moléculas de actina o tubulina, las cuales adquieren una conformación que permite que otras moléculas se añadan después con rapidez y se forme un polímero que puede ser un microtúbulo o un microfilamento. La polimerización llega a un estado estacionario que representa un equilibrio dinámico entre las proteínas solubles y los polímeros formados. Esto es, que la concentración del monómero o del heterodímero en las pozas, cae de tal forma que monómeros o dímeros se empiezan a desprender del polímero a la misma velocidad con que se añaden al otro extremo.

El ATP se hidroliza durante la polimerización de la actina, y el GTP se hidroliza durante la polimerización de la tubulina.

El ATP se hidroliza durante la polimerización de la actina, y el GTP se hidroliza durante la polimerización de la tubulina. Además, cada dímero de tubulina posee otra molécula de GTP unida fuertemente, pero no se requiere para la polimerización.

La hidrólisis de nucleótidos durante la polimerización permite a los monómeros y dímeros tener una conformación adecuada para ensamblarse. La afinidad de las moléculas libres por uno y otro extremo no es igual, es decir, la concentración crítica en cada uno de los extremos es diferente. A concentraciones críticas de tubulina o actina, las moléculas se agregan preferencialmente a un extremo y se despolimerizan en el otro. En este equilibrio dinámico (*steady state*) el crecimiento neto es cero. Sin embargo, hay crecimiento de filamentos o túbulos individuales y traslado de unas moléculas de un lado a otro. Este proceso requiere de energía y es coordinado con otras proteínas. Este mecanismo puede ser el que mueve y empuja a un organelo celular; la hipótesis se ha planteado para explicar la mitosis y es, hasta el momento, la más probable.

Como se ha señalado, existe polaridad en los microtúbulos y en los microfilamentos, esto es, los dos extremos de la estructura crecen y se despolimerizan a velocidades muy diferentes. Los extremos de los microtúbulos se asocian a centriolos que son los centros organizadores de microtúbulos. A partir de ellos, los microtúbulos crecen con una polaridad determinada. El extremo negativo se sitúa en el centriolo y el positivo (por donde crecen) hacia la membrana plasmática. Los microfilamentos también tienen polaridad y crecen en el extremo negativo, que es el que está en contacto con la membrana plasmática.

Si se utiliza un axonema de cilios o de flagelos como centro de nucleación y se añade tubulina en solución, cuando se observa al microscopio electrónico se ve que los extremos del axonema crecen a diferente velocidad. Al extremo que crece más rápido se le denota con el signo (+) y es el

que está más lejos del cuerpo basal. Lo mismo sucede con los filamentos de actina cuyo extremo (+) está en la línea Z del sarcómero o en la membrana celular. La polimerización *in vitro* de la tubulina se inhibe con la presencia de Ca^{2+}, a menos que la calmodulina u otras proteínas reguladoras estén presentes. Se requiere, además, de la presencia de otras proteínas como las MAPs y las Tau para la polimerización. De manera similar, la polimerización de la actina es regulada por proteínas que se asocian a ella tanto en su forma soluble como filamentosa, y que favorecen o inhiben la formación de filamentos, de acuerdo a las necesidades de la reacción.

Recientemente, se ha descrito que la ADP ribosilación de la actina inhibe su polimerización. También se ha descrito a una cinasa de actina que modula la polimerización de los microfilamentos a través de la fosforilación de la actina que está unida a la membrana y cuyo efecto es inhibitorio de la nucleación.



Proteínas asociadas a los microtúbulos y microfilamentos

En los microtúbulos que forman el axonema de cilios y flagelos se encuentra la dinaína. Esta proteína se dispone como pares de brazos, a lo largo de los microtúbulos. Existe otra proteína, la nexina, que forma uniones entre los pares de túbulos adyacentes. En el par central, también formado de microtúbulos, hay estructuras radiales que unen a los pares externos, y una cubierta que rodea al par central, todos ellos formados de proteínas diferentes. La dinaína es una ATPasa y es la responsable del deslizamiento de los microtúbulos de cada par. Este deslizamiento causa el movimiento y batir de los cilios y de los flagelos. Existen mutantes del alga *Chlamydomonas* que son incapaces de moverse, debido a que, en la mayoría de ellas, una proteína del axonema está ausente y esto conduce a que las mutantes pierdan su capacidad de motilidad. Varias formas de esterilidad en los humanos se han asociado con la falta de motilidad de los flagelos de los espermatozoides. El mismo defecto se encuentra presente en los cilios del tracto respiratorio de estos individuos y, como resultado, estos pacientes tienen dificultad para drenar el tracto respiratorio de secreciones. En este caso, como en el de *Chlamydomonas*, se alteran las proteínas asociadas a los microtúbulos. La dinaína también se ha encontrado en el citoplasma y, al igual que la cinesina, podrían actuar como motores celulares en las diferentes funciones de los microtúbulos citoplasmáticos.

Las proteínas asociadas a los microtúbulos citoplasmáticos (tabla 9-1) son de varios tipos: las llamadas "MAPs" (proteínas asociadas a los microtúbulos) de alto peso molecular (210,000 a 230,000 daltones) y los factores Tau (58,000 a 65,000 daltones). MAPs y factores Tau inducen la polimerización *in vitro* de la tubulina purificada. Se unen a los microtúbulos formados por un lado de la molécula, y, en el otro extremo, se unen a varias moléculas de tubulina a la vez, sirviendo como sitio de nucleación. En el caso de la actina, se ha identificado un gran número de proteínas asociadas tanto a la proteí-

Las proteínas asociadas a los microtúbulos citoplasmáticos (tabla 9-1) son de varios tipos: las llamadas "MAPs" (proteínas asociadas a los microtúbulos) de alto peso molecular (210,000 a 230,000 daltones) y los factores Tau.

Tabla 9-1. Proteínas asociadas a elementos del citoesqueleto.

Microtúbulos*	Microfilamentos*	Filamentos intermedios*
MAPs	Miosinas: contracción y desplazamiento (motores)	Filagrina
Factor TAU	Fimbrina: forma haces	Sinemina
Dinaína, Nexina, Cinesina: Proteínas motoras	Vellosina, Gelsolina: rompen filamentos y sellan sus extremos	Epinemina
	Alfa actinina, Beta actinina: entrecruzadoras	Filensina
	Vinculina, Talina: se asocian a placas de adhesión	Paranemina
	Caldesmon	
	Espectrina: forma redes	
	Acumentina: sella extremos de los filamentos	
	Tropomiosina, Troponina: estabilizan los microfilamentos	

* Se mencionan sólo las mejor caracterizadas.

na soluble como a los filamentos de actina para formar haces y estructuras más complejas (tabla 9-1).

Una gran proporción de la actina soluble está asociada a una proteína llamada profilina, con peso molecular de 16,000 daltones. Este péptido se une reversible y rápidamente a la actina G, retardando su polimerización en filamentos. La desoxirribonucleasa I se une también a actina soluble, aunque hay algunas excepciones como es el caso de *Entamoeba histolytica* y *Naegleria*. Otras proteínas que se unen a la actina, como la filamina y la alfa-actinina hacen entrecruzamientos con los microfilamentos, produciendo redes. La vellosina y la gelsolina son proteínas que rompen los filamentos de actina con actividad dependiente de calcio, y sirven como centros de nucleación en el ensamble de los microfilamentos. Caldesmon ayuda a formar haces de filamentos de actina. Algunas proteínas se unen al extremo que crece de los filamentos durante la polimerización e impiden la adición de nuevos monómeros. Vinculina y talina se localizan junto con la actina en las placas de adhesión que forman las células al adherirse a un sustrato. Algunos receptores membranales se conectan con filamentos de actina para moverse en la superficie celular.

La acción coordinada de todas estas proteínas regula las funciones, que, en forma general, se refieren a funciones del citoesqueleto, por lo que su estudio requiere de enfoques múltiples que permitan determinar las bases moleculares de las estructuras para, de ahí, poder entender la función. En

años recientes se ha acumulado evidencia que indica que el citoesqueleto tiene un papel importante en las respuestas desencadenadas por señales químicas, hormonales y la unión de ligandos específicos a sus receptores. Es importante, entonces, considerar el papel del citoesqueleto en la transducción de señales celulares.

Transducción de señales

La comunicación entre las células es básica para el desarrollo y la organización de los tejidos, para inducir respuestas a factores externos y, en general, para la función normal de los organismos. Las señales químicas y hormonales consideradas como los primeros mensajeros pueden ser recibidas a nivel de la membrana plasmática por receptores específicos, o bien a nivel intracelular por receptores citoplasmáticos. La recepción de una señal o primer mensajero se traduce en una cascada de episodios moleculares, que se conoce como proceso de transducción de señales. Esta cascada incluye la producción de segundos mensajeros y culmina en la generación de una respuesta biológica. Actualmente se sabe que el citoesqueleto es modulado por segundos mensajeros.

Se han descrito varias vías de transducción de señales. Las que se han involucrado en el modelaje del citoesqueleto son: la del AMPc, la del fosfatidil inositol y la del calcio. Estas vías tienen en común que la señal percibida en la membrana plasmática activa a una familia de proteínas transductoras. Éstas, a su vez, activan a las enzimas efectoras que producen un segundo mensajero que activa a un efector secundario. En el caso de la vía de transducción del AMPc, el segundo mensajero es el AMPc y activa a la proteína cinasa A; la activación de la vía del fosfatidil-inositol genera por acción de la fosfolipasa C, al fosfatidil-inositol y al diacilglicerol como segundos mensajeros. Los efectores secundarios en esta vía son el calcio y la proteína cinasa C, respectivamente. Uno de los efectores del calcio es la calmodulina. La unión del calcio a la calmodulina induce un cambio conformacional en esta proteína y la activa. El complejo calcio-calmodulina interacciona entonces con proteínas estructurales o activa diferentes enzimas entre éstas a la multiproteína cinasa II que fosforila proteínas del citoesqueleto.

La dexametasona, los glucocorticoides y la melatonina son ejemplos de hormonas que modulan la organización de los filamentos intermedios de citoqueratinas, los microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios de vimentina, respectivamente.

Las proteínas asociadas a la actina (filamina, profilina, vinculina, talina, cinasa de la cadena ligera de la miosina); las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs y Tau); y las proteínas de los filamentos intermedios (vimentina, desmina, citoqueratinas, proteínas de neurofilamentos) son sustratos de la proteína cinasa A, la proteína cinasa C y la multiproteína cinasa II dependiente de calmodulina.

La fosforilación de las proteínas del citoesqueleto por estas cinasas modifican su estado de ensamble. Por ejemplo, la fosforilación de la vinculina

y la talina por la proteína cinasa C participa en la formación de las placas de adhesión de organismos unicelulares y de células de mamífero. La fosforilación de las MAPs, induce cambios conformacionales en estas proteínas que resultan en el anclaje de los filamentos intermedios a los microtúbulos. La activación de la proteína cinasa C se acompaña de su traslado del citosol al citoesqueleto cortical en donde fosforila a las proteínas de filamentos intermedios, causando el desensamble de los mismos, o al fosforilar proteínas asociadas a actina favorece la formación de placas de adhesión. La cinasa C, al fosforilar a las proteínas asociadas a actina, puede también cambiar la organización de las fibras de tensión y otros ensambles de actina. En las células epiteliales, estos cambios se acompañan por un aumento en la permeabilidad celular y en la cantidad de actina polimerizada. También existe evidencia sobre la unión directa de la proteína cinasa C a proteínas del citoesqueleto. La PKCε se une a la actina y se ha relacionado con la exocitosis de glutamato de las terminales nerviosas. La PKC también se ha localizado asociada con los filamentos intermedios.

Por último, también existen evidencias que indican que la calmodulina activada por calcio modula la polimerización de la tubulina. El complejo calcio-calmodulina inhibe la polimerización de los microtúbulos por unión directa a la tubulina y a las MAPs. Además, aumenta la sensibilidad al calcio para despolimerizar a los microtúbulos. La calmodulina también se une a algunas proteínas asociadas a actina (caldesmon, espectrina, etc.) y, a través de este mecanismo, modula la organización de los microfilamentos. A la fecha, no se sabe si la calmodulina por unión directa a proteínas de filamentos intermedios participa en la modulación de su ensamble.

La participación del citoesqueleto en procesos regulatorios de las células, a través de sus modificaciones durante la recepción de señales y la producción de una respuesta, nos indica una vez más que se trata de una estructura dinámica, que no sólo funciona como soporte mecánico en la célula. El citoesqueleto, formado por la asociación de moléculas en ensambles complejos con capacidad de generar movimiento y respuestas de varios niveles en la célula, es hoy en día una de las estructuras celulares más interesantes para estudiar y llegar a entender la fisiología celular.



Referencias bibliográficas

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts y Watson, J.D., "The cytoskeleton", en *Molecular Biology of the Cell*", Garland, ed., New York Publishing, Inc., 3a. ed., 788, 1995.

Brabander, M.J., "El citoesqueleto y la vida celular", *La Recherche,* **28:** 922-933, 1984.

Bryan, J., "Microtubules", *Bioscience,* **24:** 701-711, 1979.

Dustin, P., "Microtubules", *Scientific American,* **243:** 66-76, 1980.

Fulton, A.B., "How crowded is the cytoplasm?", *Cell,* **30:** 345-347, 1982.

Lazarides, E., "Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space", *Nature,* **283:** 249-256, 1980.

Meza, I. y Frixione, E., "Máquinas vivientes. ¿Cómo se mueven las células?", Fondo de Cultura Económica, Serie la Ciencia desde México, 1996.

Schliwa, M. y Van Blerkom, J., "Structural interaction of cytoskeletal components", *Journal of Cell Biology,* **90:** 222-235, 1981.

Spudich, J.A., "How molecular motors work", *Nature,* **372:** 515-518, 1994.

Weatherbee, J.A., "Membranes and cell movement; interactions of membranes with the proteins of the cytoskeleton", *International Review of Cytology,* Suplemento 12, 1981.

Wolosewich, J.J. y Porter, K.R., "Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance: Artifact or reality?", *Journal of Cell Biology,* **82:** 114-139, 1979.

CAPÍTULO 10

LAS MITOCONDRIAS

Marietta Tuena de Gómez–Puyou ■ Armando Gómez-Puyou



Introducción

Las mitocondrias se conocen desde hace más de un siglo, y en su historia se encuentra el trabajo de cientos de investigadores de distintas disciplinas e intereses. Por muchos años los citólogos las estudiaron exhaustivamente, descubrieron cómo teñirlas y fueron de los primeros organelos con los que probaron las bondades de la microscopia electrónica. En la bioquímica, el descubrimiento de que en las mitocondrias se lleva a cabo la respiración y la síntesis de ATP dio origen a innumerables estudios sobre cómo la oxidación de ciertos sustratos da lugar a la formación de energía utilizable en procesos metabólicos. Para los biofísicos, las mitocondrias han sido un sistema ideal para indagar cómo se llevan a cabo los fenómenos de transporte a través de una membrana. En la biología molecular, el conocimiento de que algunas proteínas mitocondriales se forman con la información conjunta del DNA nuclear y mitocondrial inició una serie inmensa de investigaciones sobre cómo la información genética se coordina entre distintos compartimentos intracelulares. Para los cristalógrafos, las proteínas de las membranas mitocondriales han representado un verdadero desafío, ya que en la membrana interna mitocondrial se encuentran algunas de las proteínas más complejas del mundo biológico. En la medicina, se han abierto nuevos panoramas con el descubrimiento de que algunas enfermedades congénitas tienen su origen en alteraciones del DNA mitocondrial.



Aislamiento y estructura de las mitocondrias

Probablemente, el primero en describir las mitocondrias fue R. Altman en 1890; las identificó como unas estructuras intracelulares a las que llamó mioblastos. Cuatro años después, Benda denominó a esas estructuras mitocondrias (del griego *mitos*, hilo y *condros*, gránulo). En 1900,

L. Michaelis encontró que el verde de Jano B teñía a las mitocondrias y, durante varios años, esta tinción se utilizó en su identificación. También se conjeturó sobre cuál podría ser la función de las mitocondrias, y algunos investigadores propusieron que podrían estar relacionadas con la respiración. Sin embargo, las pruebas definitivas sobre la función mitocondrial no se obtuvieron sino hasta que se lograron separar del resto de los componentes intracelulares.

La metodología para separar las mitocondrias se conoce como centrifugación diferencial o fraccionamiento subcelular. Esta técnica se utiliza rutinariamente en prácticamente todos los laboratorios del mundo, pero sus inicios se remontan a los trabajos de Albert Claude, en la década de 1940. Claude estableció las bases para la obtención de organelos intracelulares, morfológica y bioquímicamente intactos. En un primer paso, el tejido o las células se rompen en condiciones en que no se dañen las estructuras intracelulares; en el vocabulario bioquímico, decimos que se homogenizan las células o el tejido. A continuación, el homogenado se somete a una fuerza centrífuga relativamente baja; el sedimento contiene núcleos y tejido o células que no se desintegraron. El sobrenadante que contiene la mayoría de las mitocondrias se centrifuga a entre 7,000 y 8,000 g. Las mitocondrias son el componente principal del sedimento que se obtiene de esta última centrifugación.

Las mitocondrias son organelos que están separados del resto del citoplasma por dos membranas.

Claude también fue el primero en estudiar la morfología de las mitocondrias bajo el microscopio electrónico. Las mitocondrias son organelos que están separados del resto del citoplasma por dos membranas. La que está en contacto con el citoplasma se conoce como membrana externa. Ésta rodea a otra membrana, llamada membrana interna. La parte interna de esta última membrana limita el espacio interno de las mitocondrias que se denomina matriz mitocondrial (figura 10-1). La membrana interna presenta invaginaciones hacia la matriz mitocondrial que se conocen como crestas mitocondriales. Dada la presencia de dos membranas, en las mitocondrias hay tres espacios. El que está en el exterior de las mitocondrias; en la célula,

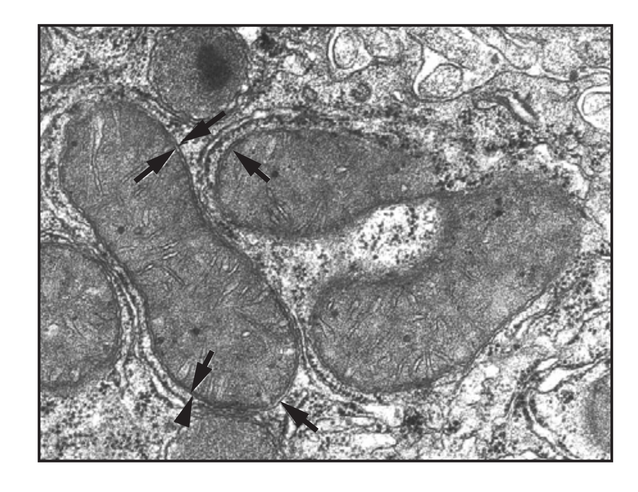


Figura 10-1. La estructura de las mitocondrias de hígado de rata bajo el microscopio electrónico. Las flechas señalan las membranas externas e internas. El Dr. Alfonso Cárabez, de la Universidad Nacional Autónoma de México, proporcionó la micrografía.

es el citoplasma celular y constituye el espacio extramitocondrial, mientras que en las mitocondrias aisladas en el laboratorio, este espacio lo forma la solución que el investigador desee. Entre la membrana interna y la externa existe el espacio intermembranal, y finalmente, el tercer espacio lo forma la matriz mitocondrial.

Por regla general, todas las células de organismos eucariontes tienen mitocondrias, pero hay excepciones. Nuestros glóbulos rojos y las amibas carecen de mitocondrias, y en un estadio del ciclo de vida del *Trypanosoma brucei* sus mitocondrias prácticamente desaparecen. Es pertinente señalar que, en la mayoría de las células, las mitocondrias son alargadas, pero, en algunos organismos, son globulares; también existen variaciones en el tamaño; en los espermatozoides, las mitocondrias son muchas veces más grandes que las mitocondrias de otras células. Su distribución en el citoplasma también es variable; a veces se observan con una distribución que hasta donde se puede ver es al azar, pero, en ciertas células, las mitocondrias se localizan predominantemente en un sitio determinado. Por ejemplo, en el músculo esquelético se encuentran principalmente sobre una de las bandas que forman las fibras musculares. Se desconoce por qué hay variaciones en morfología, y qué es lo que ocasiona que, en algunas células, las mitocondrias tengan una localización preferencial.



La principal función de las mitocondrias es sintetizar ATP

Para comprender la importancia de la función principal de las mitocondrias, es necesario recordar dos puntos. El primero es que todos los organismos requieren energía para vivir. El segundo es que el único tipo de energía que los seres vivos utilizan, directa o indirectamente, es la que se encuentra en el ATP (una recopilación de los trabajos que dieron lugar a los conceptos básicos de la bioenergética se encuentra en Kalchar, 1969). En otras palabras, el ATP es la moneda con la que se pagan todos los procesos endergónicos que ocurren en todos los organismos vivientes. De hecho, no es posible aceptar que exista vida (cuando menos como hasta ahora la conocemos) sin la existencia de ATP.

En los organismos aeróbicos (como nosotros), más de 90% del ATP que se necesita para mantener la vida proviene de las mitocondrias; el resto se forma en las glicólisis anaeróbicas. El cómo las mitocondrias forman ATP ha sido un problema que ha mantenido ocupados a investigadores de todo el mundo por más de seis décadas, y el problema aún no se resuelve. Sin embargo, mucho se ha aprendido sobre cómo la maquinaria enzimática mitocondrial lleva a cabo la síntesis de ATP.

En los organismos aeróbicos (como nosotros), más de 90% del ATP que se necesita para mantener la vida proviene de las mitocondrias.

Antes de describir los conocimientos actuales sobre la síntesis de ATP, es necesario revisar algunas de las características del ATP. En principio el ATP es una molécula relativamente simple, que está formada por una adenina, una ribosa y tres fosfatos. La unión entre los fosfatos se conoce como unión pirofosfato.

El ATP es una molécula relativamente simple, que está formada por una adenina, una ribosa y tres fosfatos.

Trifosfato de adenosina

El ATP es la molécula que las células utilizan como fuente de energía; pero, ¿cómo proporciona el ATP esta energía? Se ha demostrado que cuando el ATP se hidroliza a ADP y fosfato, se libera energía; ésta es de aproximadamente 7,500 calorías por mol. En otras palabras, en la unión pirofosfato que se encuentra entre los dos últimos fosfatos del ATP (el β y el γ) se almacena energía que se puede utilizar para hacer trabajo, y ésta es precisamente la que todos los seres vivos utilizan para llevar a cabo sus funciones dependientes de energía. De esta manera, vemos que el motor del mundo biológico es la reacción:

$$\text{ATP} + H_2O \rightarrow \text{ADP} + \text{fosfato} + 7{,}500 \text{ cals (ver texto)} \qquad (1)$$

En todo momento de la vida de un organismo se llevan a cabo funciones que requieren energía, es decir, síntesis de proteínas o ácidos nucleicos, transporte de iones a través de sus membranas, transmisión nerviosa, absorción de moléculas necesarias, excreción de sustancias indeseables, contracción muscular, etc. Esto implica que el ATP se gaste continuamente y, por lo tanto, el ATP se tiene que sintetizar constantemente. Formar el ATP que se gasta constituye la función fundamental de las mitocondrias. Para tener una idea de cuánto ATP sintetizan las mitocondrias, se puede mencionar que una persona de 60 kilos que gasta diariamente unas 3,000 calorías hidroliza y sintetiza alrededor de medio kilo de ATP por día.

> Una persona de 60 kilos que gasta diariamente unas 3,000 calorías hidroliza y sintetiza alrededor de medio kilo de ATP por día.

Se sabe que en todos los organismos, la síntesis de ATP se hace a partir de ADP y fosfato. Es decir, la síntesis de ATP es la misma reacción que la hidrolítica, sólo que en sentido inverso, es decir,

$$\text{ADP} + \text{fosfato} + 7{,}500 \text{ cals} \rightarrow \text{ATP} + H_2O \text{ (ver texto)} \qquad (2)$$

Debido a que en la reacción hidrolítica se liberan por mol de ATP cerca de 7,500 calorías, la síntesis del ATP a partir de ADP y fosfato requiere forzosamente un aporte de cuando menos 7,500 calorías por mol.

> La mayor parte del ATP que las células necesitan para vivir proviene de las mitocondrias.



La cadena respiratoria mitocondrial

Ya que la mayor parte del ATP que las células necesitan para vivir proviene de las mitocondrias, es lógico pensar que en las mitocondrias tienen que

existir una fuente de energía para la síntesis de ATP y un mecanismo que sea capaz de captar esa energía y transformarla en ATP. En las mitocondrias, el sistema que aporta la energía para la síntesis de ATP, se conoce como cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones. La cadena está formada por una serie de enzimas diseñadas por la evolución para aceptar y ceder electrones, o sea que su función es la de reducirse (aceptar electrones) y oxidarse (perder electrones). El aceptor final de los electrones que viajan por la cadena respiratoria es el oxígeno. De hecho, la mayor parte del oxígeno que nosotros respiramos se usa para aceptar los electrones que pasan por la cadena respiratoria; después de que un átomo de oxígeno recibe dos electrones, éste reacciona con dos H^+ y forma una molécula de agua.

> En las mitocondrias, el sistema que aporta la energía para la síntesis de ATP, se conoce como cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones.

La identificación de las enzimas que componen la cadena respiratoria y las moléculas que le aportan electrones es una de las historias más arduas y bellas de la bioquímica. Los estudios se iniciaron antes de que se contara con las técnicas para aislar mitocondrias. En la década de 1930, Engelhardt, Krebs, Belitser y Tsybakova, Kalckar y Ochoa por medio de experimentos en homogenados lograron descifrar la secuencia de las reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y demostraron que su oxidación se acompaña de formación de ATP, a partir de ADP y fosfato.

Posteriormente y gracias al desarrollo de metodologías para la obtención de mitocondrias, Kennedy y Lehninger demostraron que las mitocondrias son los únicos organelos intracelulares que pueden oxidar los sustratos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y que este proceso se acompaña de formación de ATP. Con este descubrimiento se iniciaron los estudios cuyo objetivo es explicar los mecanismos de transducción de energía a nivel molecular. Después de 50 años, las investigaciones continúan.

Como se mencionó, el viaje de los electrones a través de la cadena respiratoria es la fuente de energía para la síntesis de ATP. ¿Cómo es la cadena? Un hecho afortunado para los investigadores que estudian la cadena respiratoria es que la mayoría de sus componentes poseen características espectroscópicas definidas, es decir, que tienen la capacidad de absorber luz de determinada longitud de onda, cuando están en estado reducido u oxidado. Ya que algunos de los componentes de la cadena respiratoria tienen un color característico, Keilin los denominó citocromos (del griego *citos*, célula y *cromos*, color). En la figura 10-2, se muestra el espectro de absorción diferencial de los citocromos de la cadena respiratoria.

> El viaje de los electrones a través de la cadena respiratoria es la fuente de energía para la síntesis de ATP.

> Algunos de los componentes de la cadena respiratoria tienen un color característico, Keilin los denominó citocromos.

Hay varios puntos de interés en los espectros de los citocromos de la cadena respiratoria mitocondrial que se muestran en la figura 10-2: i) los distintos citocromos absorben luz a longitudes de onda diferentes, lo cual permite su identificación, y ii) la absorción de luz es diferente cuando un citocromo está en estado oxidado o reducido. Por lo tanto, es posible saber cuándo determinado citocromo tiene o no electrones; es decir, si está en su estado reducido u oxidado. Estas características de los citocromos han permitido seguir por técnicas de registro rápido (y, a veces, a temperaturas de nitrógeno líquido) la cinética de transferencia de electrones, a través de los citocromos, hasta que llegan al oxígeno.

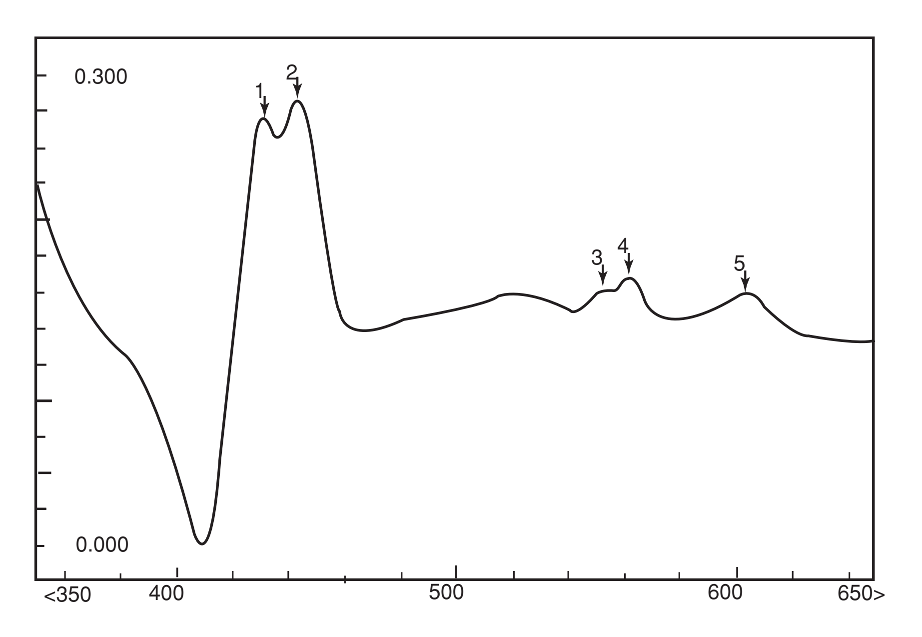


Figura 10-2. Espectros de absorción de los citocromos de la cadena respiratoria mitocondrial. Para obtener el espectro que se muestra, se colocaron partículas submitocondriales de corazón de res en una celda del espectrofotómetro que contenía un amortiguador de fosfatos pH 7.4 y se registró su espectro de absorción entre 350 y 650 nm. En ausencia de sustrato, los citocromos están en estado oxidado. Posteriormente, se añadió un agente reductor con el objeto de reducir todos los componentes de la cadena. Finalmente con la ayuda de una computadora, se restó el espectro obtenido en condiciones reductoras del que se obtuvo con los citocromos en estado oxidado. El espectro resultante se muestra en la figura; la ordenada muestra la magnitud de la absorción a distintas longitudes de onda (abscisa). Se distinguen fácilmente varios picos de absorción. Las flechas señalan los picos de absorción de los siguientes citocromos: 1 = citocromo b; 2 = citocromo oxidasa; 3 = citocromo c; 4 = citocromo b (una segunda longitud de onda a la que absorbe el citocromo b) 5 = un segundo pico de absorción de la citocromo oxidasa. El Dr. Edgardo Escamilla, de la Universidad Nacional Autónoma de México, hizo el experimento y proporcionó el espectro.

Por medio de estas técnicas, y otras que por ahora no se discutirán, se pudo aclarar el camino que los electrones siguen a través de los componentes de la cadena respiratoria, hasta que finalmente llegan al oxígeno. En la figura 10-3 se ilustran los acarreadores de electrones, así como un esquema de la estructura de los distintos citocromos. Es importante señalar que los citocromos, excepto el citocromo c, son proteínas complejas formadas por varias subunidades, y no ha sido sino hasta los últimos años cuando se ha logrado conocer las subunidades que las forman y cómo éstas se colocan en la membrana para formar una estructura funcional.

La coenzima Q, es el único componente de la cadena respiratoria que no es una proteína.

Para su funcionamiento, son necesarias otras enzimas y coenzimas (para una revisión sobre el tema, ver González-Halphen y Vázquez, 1995). Las enzimas son la NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa (en la figura 10-3, éstas se representan como complejo I y II, respectivamente). En el viaje de los electrones por la cadena respiratoria también participa la coenzima Q; éste es el único componente de la cadena respiratoria que no es una proteína. La coenzima Q es una molécula relativa-

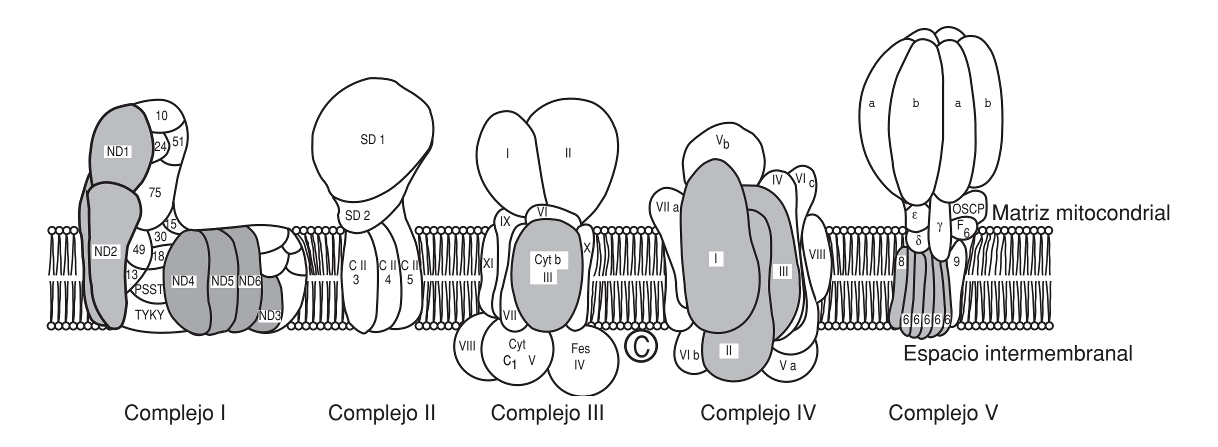


Figura 10-3. Esquema de los componentes enzimáticos de la cadena respiratoria y su disposición en la membrana interna de las mitocondrias. Se muestra un esquema de cómo están colocadas y orientadas en la membrana mitocondrial interna las distintas subunidades que forman las enzimas de la cadena respiratoria. El citocromo c (c en el dibujo) está formado por una sola unidad proteica, pero el resto de las enzimas son proteínas formadas por múltiples subunidades. El complejo HI es la NADH deshidrogenasa; el II es la succinato deshidrogenasa; el III es el citocromo bc_1; el IV es la citocromo oxidasa, o citocromo a + a_3; el V es la ATP sintasa. En la medida en que se acumulen más datos experimentales, es posible que el arreglo entre las distintas subunidades se modifique. Los Drs. D. González Halphen y M. Vázquez Acevedo elaboraron el esquema que está publicado en Mensaje Bioquímico XIX, p. 61-93, 1995; se agradece su consentimiento para su reproducción.

mente pequeña, soluble en solventes orgánicos (y, por lo tanto, se localiza en el interior de la membrana mitocondrial) que tiene la capacidad de reducirse y oxidarse. Su papel en las mitocondrias es el de aceptar electrones de las deshidrogenas del NAD y la succinato deshidrogenasa, para luego cederlos al citocromo bc_1 (complejo III en la figura 10-3).

Los organismos aeróbicos siempre estamos consumiendo oxígeno; esto quiere decir que constantemente están llegando electrones al oxígeno, y que, por lo tanto, tiene que existir una fuente de electrones. En la mayoría de los organismos, algunos de los componentes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos son los donadores de electrones más importantes. Estas moléculas se oxidan por deshidrogenasas que son NAD dependientes. Los electrones los recibe el NAD que se reduce a NADH, el cual, por medio de una NADH deshidrogenasa, los transfiere a la coenzima Q. El succinato, otro sustrato del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, transfiere sus electrones a la deshidrogenasa succínica (una flavoproteína) que a su vez los pasa a la coenzima Q. La coenzima Q, a su vez, cede los electrones al citocromo bc_1. Del citocromo bc_1 los electrones pasan al citocromo c y después a la citocromo oxidasa; este último citocromo también se conoce como citocromo a + a_3, o como complejo IV, que es como se muestra en la figura 10-3. Finalmente, la citocromo oxidasa transfiere sus electrones al oxígeno y da lugar a la formación de una molécula de agua al combinarse con dos H^+.

En resumen, la cadena respiratoria es el camino que los electrones siguen desde su origen en los sustratos oxidables del ciclo de los ácidos tri-

carboxílicos hasta el oxígeno. En realidad, la cadena de transporte de electrones se puede ver como una vía metabólica integrada por distintas enzimas y los cofactores NAD, FAD y coenzima Q. El destino final de los electrones es el oxígeno, y se hace énfasis en que el destino final del oxígeno, al recibir dos electrones, es el de formar moléculas de agua.



Cambios de energía durante el flujo de electrones por la cadena respiratoria

Una cosa es conocer la secuencia de las reacciones que ocurren en la cadena respiratoria, y otra saber como esta serie de reacciones proporciona la energía necesaria para sintetizar ATP. Aquí es necesario recordar que cuando una reacción sucede es porque existe un cambio favorable de energía. Es decir, las reacciones son posibles únicamente cuando existe liberación de energía. El transporte de electrones desde un sustrato hasta el oxígeno es un proceso favorable, y por tanto en la transferencia de electrones existe liberación de energía. Se ha determinado cuanta energía se libera en la transferencia de electrones en cada una de las reacciones de la cadena respiratoria.

Cuando los electrones pasan por la cadena respiratoria, la energía se libera por pasos. Debido a esto, el paso de los electrones por la cadena respiratoria se ha comparado a una cascada en la que los electrones caen a distintos niveles y en cada uno de ellos se libera cierta cantidad de energía. La figura 10-4 muestra los cambios de energía que ocurren cuando los electrones viajan por la cadena respiratoria.

Los cambios de energía que ocurren en la cadena respiratoria adquieren importancia particular si se recuerda que la síntesis de ATP requiere un

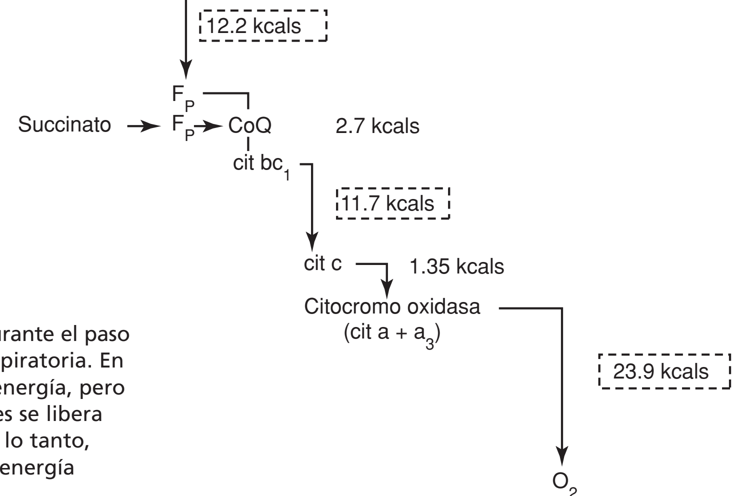


Figura 10-4. Cambios de energía durante el paso de los electrones por la cadena respiratoria. En todos los pasos hay liberación de energía, pero es de notar que sólo en tres lugares se libera más de 7,500 calorías por mol. Por lo tanto, sólo en tres sitios existe suficiente energía para formar ATP.

aporte energético de cuando menos 7,500 calorías. En la figura 10-4 se puede observar que en sólo tres pasos se liberan más de 7,500 calorías: entre el NADH y la coenzima Q, en el paso del citocromo bc_1 al c, y en la reducción de oxígeno por la citocromo oxidasa. Esto implica que en esos tres sitios se libera la cantidad de energía que se necesita para sintetizar ATP.



Síntesis de ATP en mitocondrias. Fosforilación oxidativa

El diagrama de los cambios de energía durante el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial indica que no hay impedimento energético para impulsar la reacción de ADP + fosfato para dar ATP. En muchos laboratorios se ha estudiado cuánto ATP se forma durante el viaje de los electrones a través de la cadena respiratoria y qué es lo que sucede con el transporte de electrones cuando hay formación de ATP. Uno de los experimentos clásicos consiste en medir la velocidad con que se consume oxígeno cuando las mitocondrias están formando, o no, ATP. En estos experimentos, se incuban mitocondrias con un sustrato oxidable y fosfato en un medio en que se conserva la estructura y función de las mitocondrias (figura 10-5); se hace notar que, en estas condiciones, no se forma ATP, ya que en el sistema no se ha incluido ADP. En este estado, la velocidad a la que las mitocondrias consumen oxígeno es baja, pero el consumo de oxígeno aumenta dramáticamente cuando se añade ADP. Experimentalmente se puede ver que en este último estado las mitocondrias sintetizan ATP a partir del ADP y fosfato que se introdujo. Otro dato importante en estos experimentos es que la velocidad respiratoria disminuye a su nivel original cuando todo el ADP se ha transformado en ATP.

Es de importancia señalar que el experimento de la figura 10-5 muestra que la formación de ATP, o sea la fosforilación del ADP, está íntimamente unida a la respiración, o sea a la oxidación de los sustratos. De hecho, el proceso general de formación de ATP acoplado a la oxidación se conoce como fosforilación oxidativa.

En estos experimentos también se ha calculado cuánto ATP se forma por átomo de oxígeno consumido (figura 10-5). Se ha visto que durante la oxidación de un sustrato que depende de NAD, la cantidad de ATP que se forma por átomo de oxígeno es cercana a 3; con succinato como sustrato que alimenta electrones a la coenzima Q por acción de la deshidrogenasa succínica, la cantidad de ATP sintetizado es cercana a 2. Con ascorbato, un sustrato no natural que alimenta electrones al citocromo c, sólo se forma un ATP. Estos datos ilustran que la cantidad de ATP que se forma depende del sitio de la cadena respiratoria al que penetran los electrones, lo cual está totalmente de acuerdo con los cambios de energía que ocurren durante el paso de electrones por la cadena respiratoria, es decir, sólo cuando se utiliza NADH como sustrato, los electrones pasan por tres sitios en que se liberan más de 7,500 calorías (figura 10-4). Cuando los electrones pasan por sólo dos sitios en que se liberan más de 7,500 calorías, únicamente se forman dos ATP, como es el caso del experimento mostrado en la figura 10-5.

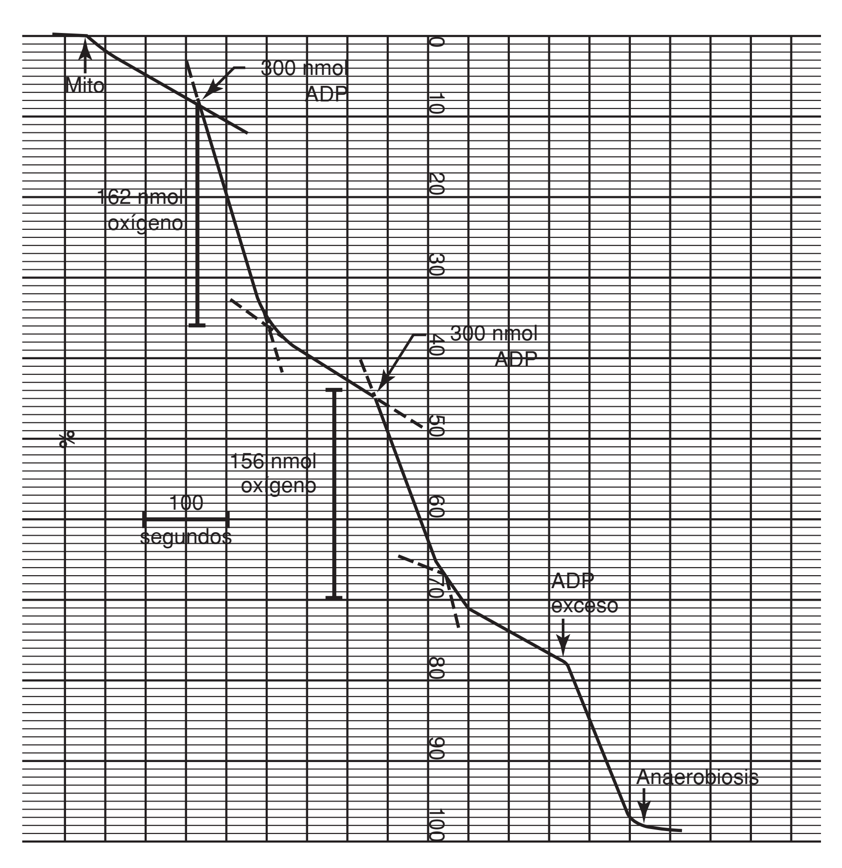


Figura 10-5. La respiración mitocondrial en condiciones de síntesis de ATP. En estos experimentos se midió el consumo de oxígeno de mitocondrias antes, durante y después de que iniciara la síntesis de ATP. El consumo de oxígeno se midió con un electrodo que registra cómo la concentración de oxígeno del medio varía con el tiempo. En el tiempo cero, se inyectaron mitocondrias (Mito) a un medio que contenía succinato y fosfato, ambos en exceso; el medio también contenía KCl y sacarosa (para mantener la tonicidad), $MgCl_2$ y un amortiguador a pH 7.4. Se puede observar que, cuando se añade ADP (300 nmol), la velocidad respiratoria aumenta; ésta disminuye cuando el ADP se ha transformado a ATP. Se puede calcular cuánto oxígeno se consumió en la fase de respiración rápida. En la primera adición de ADP, se gastaron 162 nmol de oxígeno. La relación entre el ADP añadido (300 nmol) y el ADP consumido (162 nmol) indica cuánto ATP se forma por átomo de oxígeno que se consume (1.8). El experimento es cortesía de los Drs. Rafael Moreno Sánchez y Cecilia García, del Instituto Nacional de Cardiología.



Mecanismo de síntesis de ATP. Hipótesis quimiosmótica

La síntesis de ATP la lleva a cabo una enzima que se conoce como ATP sintasa.

Existen numerosos resultados experimentales que indican que la energía que proviene de la cadena respiratoria es la que se utiliza para formar ATP. Como se verá más adelante, la síntesis de ATP la lleva a cabo una enzima que se conoce como ATP sintasa (o complejo V en la figura 10-3). Sin embargo, esta enzima no es capaz de captar directamente la energía de óxido-reducción para sintetizar ATP. El descubrimiento íntimo de

cómo la energía de óxido-reducción se transforma en energía química ha sido uno de los capítulos de la bioquímica que más se han estudiado y discutido.

Históricamente, vale la pena mencionar que en un principio se pensó que, en las reacciones en que se desprendían más de 7,500 calorías, los acarreadores de electrones podrían formar un compuesto químico con alto contenido energético. Esta idea que se conoció como hipótesis química postulaba que la energía de dicho compuesto se utilizaba para impulsar la síntesis de ATP. Sin embargo, la hipótesis resultó insostenible, ya que nunca se logró aislar de las mitocondrias un compuesto con un alto contenido energético que fuera precursor del ATP.

Al principio de la década de 1960, P. Mitchell (Mitchell, 1961) propuso que la síntesis de ATP se llevaba a cabo a través de un mecanismo que se conoce como hipótesis quimiosmótica. En sus inicios, la propuesta se recibió con escepticismo, pero en la medida en que se acumularon datos experimentales, la hipótesis llegó a convertirse en el dogma central de la bioenergética. Es de importancia señalar que los principios de la hipótesis se aplican tanto a la transducción de energía en mitocondrias, como a aquella que ocurre en organismos fotosintéticos y en la membrana plasmática de bacterias, estructuras celulares en las que también hay cadenas de transporte de electrones y ATP sintasas.

P. Mitchell (Mitchell, 1961) propuso que la síntesis de ATP se llevaba a cabo a través de un mecanismo que se conoce como hipótesis quimiosmótica.

En la hipótesis quimiosmótica, se visualiza que el transporte de electrones da origen a la formación de una fuerza protomotriz (en la terminología de Mitchell), o un gradiente H^+, que es una forma de energía. Siguiendo a Mitchell, la energía del gradiente de H^+ la capta, y utiliza la ATP sintasa para formar ATP. En otras palabras, la fuerza protomotriz es el intermediario por el cual la energía de óxido-reducción de la cadena respiratoria se transforma en la energía del ATP. La figura 10-6 muestra en forma esquemática la hipótesis quimiosmótica.

La fuerza protomotriz es el intermediario por el cual la energía de óxido-reducción de la cadena respiratoria se transforma en la energía del ATP.

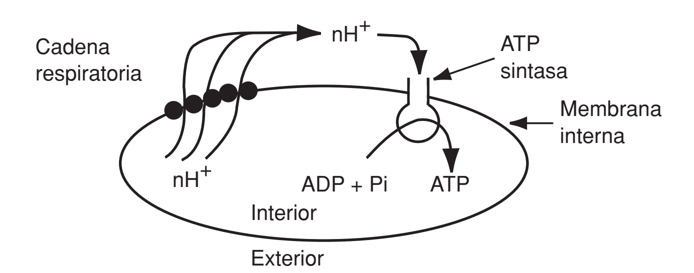


Figura 10-6. Esquema de la hipótesis quimiosmótica. En la hipótesis quimiosmótica se visualiza que el transporte de electrones se acompaña de movimiento de H^+ de un lado a otro de la membrana. En las mitocondrias, es del interior al exterior de la membrana interna; esto da lugar a la formación de un gradiente eléctrico (negativo interno) y un gradiente de pH (ácido en el exterior). El ΔpH y el $\Delta\psi$ forman la fuerza protomotriz que es la energía que la ATP sintasa utiliza para formar ATP. Esto ocurre cuando los H^+ pasan por el canal de H^+ de la ATP sintasa: su llegada a la F1 impulsa la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato.

La membrana interna tiene la ATP sintasa y todos los componentes de la cadena respiratoria.

Uno de los postulados fundamentales de la hipótesis quimiosmótica es que, para que exista síntesis de ATP, es necesario que el proceso ocurra en una membrana impermeable a H^+. Existen numerosos experimentos en mitocondrias, cloroplastos y membranas plasmáticas de bacteria que indican que esto es correcto, y es de importancia señalar que nunca se ha visto síntesis de ATP acoplado a un sistema de óxido-reducción en un sistema que no sea membranal. En cuanto a la síntesis de ATP, se desarrollaron metodologías para aislar las membranas externa e interna y la matriz mitocondrial. Así, se encontró que la membrana interna tiene la ATP sintasa y todos los componentes de la cadena respiratoria; también se demostró que en la membrana interna es donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa. A la preparación de membrana interna mitocondrial se le conoce como partículas submitocondriales; como se verá más adelante, en esta preparación se han hecho algunos de los experimentos más importantes sobre los mecanismos moleculares de conservación de energía.

La hipótesis quimiosmótica se puede resumir con la ecuación:

$$\Delta\mu_H = \Delta\psi - \frac{2.3RT}{F}\,\Delta pH$$

$\Delta\mu_H$ es el potencial electroquímico que se establece entre ambos lados de la membrana y se expresa en milivolts; y, de acuerdo con Mitchell, es la fuerza que impulsa la síntesis de ATP. Éste es igual al potencial de membrana $\Delta\psi$, y al ΔpH que también se expresan en milivolts, cuando el cambio de pH entre un lado y otro de la membrana se multiplica por 2.3 RT/F. R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta y F es el Faraday (para una revisión exhaustiva sobre la hipótesis quimiosmótica ver Nicholls, 1987).

La ecuación se entiende fácilmente si se recuerda que, de acuerdo con la hipótesis quimiosmótica, el transporte de electrones por algunos de los componentes de la cadena respiratoria se acompaña de la translocación de H^+ de un lado a otro de la membrana (figura 10-6). En las mitocondrias, el movimiento de H^+ es de la matriz mitocondrial hacia el exterior de las mitocondrias; esto da lugar a: i) una distribución asimétrica de cargas en que el interior de las mitocondrias queda más negativo que el espacio exterior ($\Delta\psi$), y ii) una distribución asimétrica de H^+, en la que el pH del exterior es más ácido que el del interior (ΔpH). Las distribuciones asimétricas son sistemas que están fuera del equilibrio y, por lo tanto, son una forma de energía, y ésta es la que la ATP sintasa utiliza para formar ATP.

Desde que se postuló, la hipótesis quimiosmótica ha estado sujeta a discusión. Sin embargo, muchos fueron los experimentos que dieron la pauta para que la hipótesis se aceptara por casi la totalidad de los investigadores. Vale la pena describir uno de estos experimentos. Jaggendorf y Uribe incubaron cloroplastos con ADP y fosfato en condiciones en que no había transporte de electrones; después, cambiaron bruscamente el pH del medio en que estaban los cloroplastos con el objeto de establecer una diferencia entre el pH del exterior y el interior de los cloroplastos, y finalmente determinaron si el cambio de pH se acompañaba de formación de

ATP. Los investigadores encontraron que, efectivamente, el cambio de pH produjo formación de ATP. Estos experimentos demostraron que en ausencia de transporte de electrones es posible formar ATP, siempre y cuando se establezca una diferencia de pH (ΔpH) entre el exterior y el interior de los cloroplastos. Posteriormente se hicieron experimentos similares en mitocondrias, y se observó que la formación de una distribución asimétrica de K^+ (un gradiente eléctrico o Δψ) también da lugar a la formación de ATP.

Estos datos fueron fundamentales, ya que demostraron que tanto un gradiente eléctrico como un gradiente de pH pueden impulsar la síntesis de ATP. Por regla general, el Δψ en conjunto con el ΔpH dan lugar a la formación de una fuerza protomotriz con la energía necesaria para la formación de ATP.



La ATP sintasa

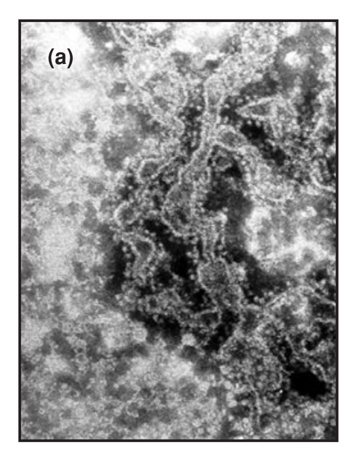
Los experimentos que se han mencionado, más otros muchos que se hicieron en membranas transductoras de energía de distintas fuentes llevaron a la conclusión de que el gradiente electroquímico de H^+ o fuerza protomotriz es el producto del transporte de electrones que impulsa la síntesis de ATP. Simultáneamente a estos trabajos, también se exploró cómo es la ATP sintasa, la enzima que transforma la energía de la fuerza protomotriz en la energía química de ATP.

> La ATP sintasa es la enzima que transforma la energía de la fuerza protomotriz en la energía química de ATP.

La enzima se ha estudiado exhaustivamente tanto desde el punto de vista estructural como funcional. Bajo el microscopio electrónico y utilizando técnicas de tinción negativa, una parte de la enzima se observa como pequeñas esferas unidas a la parte interna de la membrana mitocondrial (figura 10-7a). Desde el punto de vista molecular, la ATP sintasa es una de la enzimas más complejas que se conocen; está formada por más de 20 subunidades. La figura 10-7b muestra un esquema de cómo algunas de estas subunidades se integran para formar la ATP sintasa. Aún no se conoce con toda precisión cuál es el arreglo molecular preciso de la ATP sintasa, pero se puede considerar que la enzima consta de dos porciones; una que está sumergida dentro de la membrana, y otra que protruye de la membrana interna; se les ha llamado F0 y F1, respectivamente (figura 10-7b). Esta última porción es la que se visualiza bajo el microscopio electrónico como pequeñas esferas que protruyen de la membrana interna.

> La enzima consta de dos porciones: una que está sumergida dentro de la membrana, y otra que protruye de la membrana interna; se les ha llamado F0 y F1, respectivamente.

Pullman y cols., 1960 hicieron uno de los experimentos que fueron fundamentales para entender cómo se lleva a cabo la fosforilación oxidativa en relación a la estructura y función de la ATP sintasa. Los investigadores inicialmente separaron y purificaron la porción F1 de partículas submitocondriales. También prepararon membranas de partículas submitocondriales que tenían F0, pero no F1. A continuación, examinaron las propiedades de la F1 y de las membranas sin F1. Encontraron que las membranas podían llevar a cabo transporte de electrones y consumir oxígeno; sin embargo, la preparación era incapaz de formar ATP. También observa-



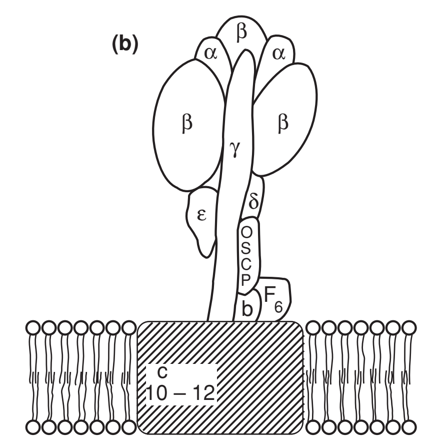


Figura 10-7. La ATP sintasa. En **a)** se muestra una micrografía de mitocondrias de hígado de rata después de tratarlas con una solución hipotónica y contrastarlas con ácido fosfotúngstico; las pequeñas esferas que protruyen de una membrana son F1 adheridas a la membrana interna. El tamaño de la F1 es de unos 90 angstroms. En **b)** se muestra un esquema de la ATP sintasa y las subunidades que la componen. La porción que está sumergida en la membrana se conoce como F0 y está formado por unas 10 subunidades c (el número no se ha determinado exactamente). La porción F0 permite el paso de H^+ del exterior de las mitocondrias hacia la porción F1. En el ensamble entre la F1 y la F0 participan otras subunidades llamadas OSCP y F6. La porción F1 está formada por 3 subunidades α, 3β, 1γ, 1δ, y 1ε (en orden decreciente de su peso molecular). Cuando la enzima está catalizando, la subunidad γ gira dentro de la cavidad que existe dentro de las subunidades α y β. La micrografía la proporcionó el Dr. Alfonso Cárabez, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ron que la porción F1 tenía la capacidad de hidrolizar ATP, pero no la de sintetizar ATP. Estos hallazgos fueron de interés, pero la observación más importante fue que al reconstituir la porción F1 a las membranas deficientes de F1, las membranas adquirieron nuevamente la capacidad de llevar a cabo fosforilación oxidativa. Con esos experimentos se llegó a la conclusión de que la fosforilación oxidativa es una función integrada por varios componentes que son aislables y reconstituibles. Los datos de estos investigadores mostraron que es posible aislar y reconstituir en sistemas artificiales, sistemas biológicos complejos. A partir de estos hallazgos se ha emprendido el aislamiento y la reconstitución de muchos sistemas. En las mitocondrias se han aislado y reconstituido prácticamente todos los componentes que forman la maquinaria enzimática mitocondrial y, en consecuencia, se puede ya saber cuál es su papel en la fosforilación oxidativa.

Los componentes de la ATP sintasa se han aislado y reconstituido y ahora se sabe cuáles son las subunidades que la forman y cuál es su función. Por ejemplo, la porción F0 es un complejo proteico que permite el paso de H^+ hacia la porción F1; en esta última es donde se lleva a cabo la síntesis de ATP, cuando recibe los H^+ que llegan a través de la F0. La ATP sintasa también contiene subunidades cuya función es la de ensamblar correctamente a la F1 con la F0 (figura 10-7b). La ATP sintasa también contiene una proteína cuya función es la de regular la síntesis e hidrólisis del ATP. En los últimos años, se ha logrado obtener la imagen cristalográfica de la F1 (Abrahams y cols., 1994) y, en consecuencia, se tiene una imagen bastante precisa de su

estructura tridimensional. También es necesario mencionar que en los últimos años se han hecho una serie de experimentos verdaderamente impresionantes. Se ha visto que durante la catálisis, la subunidad γ gira en el centro de las subunidades α y β. Es decir, la ATP sintasa es probablemente el motor rotatorio más pequeño del mundo (para una revisión reciente sobre el tema ver Proton Motive ATPases, 2000).

A pesar de que mucho se sabe sobre la ATP sintasa, cabe reconocer que aún no se conoce con certeza cómo es que la enzima transforma la energía de la fuerza protomotriz en la energía química del ATP. Sobre este punto, es de interés señalar que si la porción F1 se incuba en condiciones en que se altera la actividad del agua, se puede observar síntesis espontánea de ATP (Tuena y cols., 1993). Esto implica que la solvatación del ATP, el ADP y el fosfato está involucrada en los mecanismos íntimos de transducción de energía. También se ha visto que la cantidad de energía que se libera en la hidrólisis del ATP depende del medio en que se encuentra. El ATP es un compuesto de alta energía cuando está en un medio acuoso, pero cuando está en un medio en que no existe agua o se altera la actividad del agua, el ATP se comporta como un compuesto de baja energía. Estos datos abren un nuevo panorama de investigación sobre la contribución de la energía de solvatación en los procesos de transducción de energía.



Transporte

La membrana externa de las mitocondrias se puede considerar como una membrana libremente permeable a metabolitos; por lo contrario, la membrana interna se caracteriza por su alto grado de impermeabilidad. Esto crea una situación peculiar. Como se mencionó en líneas anteriores, en las mitocondrias la síntesis de ATP se lleva a cabo por la porción F1 de la ATP sintasa que está orientada hacia la matriz mitocondrial. En consecuencia, la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato ocurre en el interior de las mitocondrias. Sin embargo, el ATP se necesita principalmente en el exterior de las mitocondrias, ya que la mayoría de las reacciones de la célula que requieren ATP y que producen ADP y fosfato son extramitocondriales. Por lo tanto, el ADP y el fosfato tienen que penetrar al interior de las mitocondrias y el ATP tiene que salir. Los movimientos de estos metabolitos, a través de la membrana interna, así como el de sustratos oxidables, es posible gracias a la presencia de acarreadores o sistemas de transporte cuya función es la de permitir el paso o acarrear metabolitos a través de la membrana.

> La síntesis de ATP se lleva a cabo por la porción F1 de la ATP sintasa que está orientada hacia la matriz mitocondrial.

En la membrana interna de las mitocondrias se han identificado y aislado varios acarreadores (figura 10-8). Uno de los más estudiados es la translocasa de adenín nucleótidos. Este acarreador trabaja como un antiportador (una molécula que intercambia moléculas o iones entre ambos lados de la membrana). La translocasa es una proteína que se localiza en la membrana interna mitocondrial y funciona intercambiando adenín nucleótidos del exterior por los del interior. En condiciones fisiológicas, la translocasa cataliza el movimiento de ADP citoplásmico hacia el interior de las mitocondrias

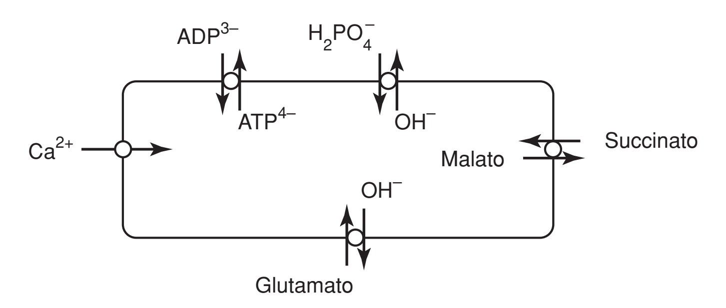


Figura 10-8. Esquema de algunos de los acarreadores que existen en la membrana interna mitocondrial. En condiciones fisiológicas, la translocasa cataliza el intercambio de ATP interno por ADP externo. A pH fisiológico, el ATP y el ADP tienen 4 y 3 cargas negativas, respectivamente; esto facilita su intercambio, en presencia de una fuerza protomotriz, ya que el lado interno es más negativo que el exterior. El acarreador de fosfato (Pi) funciona intercambiando fosfato por grupos hidroxilo. Los acarreadores de ácidos dicarboxílico por grupos hidroxilo. En presencia de una fuerza electromotriz, estos intercambios también se facilitan, ya que en el interior de las mitocondrias hay más OH^- que en el exterior. También existe intercambio de ácidos dicarboxílicos. El Ca^{2+} entra a las mitocondrias por medio de un uniportador cuando existe un potencial eléctrico negativo interno.

y expulsa el ATP de la matriz mitocondrial hacia el citoplasma. Ya que la estequiometría entre el ATP que se exporta y el ADP que penetra es de 1:1, la translocasa asegura que, por cada ATP que se sintetiza y se expulsa, siempre existe un ADP en el interior de las mitocondrias que se puede convertir en ATP.

La membrana interna mitocondrial también contiene un acarreador para fosfatos (figura 10-8); su función es la de proporcionar a la ATP sintasa el fosfato que se necesita para la formación de ATP. El acarreador de fosfatos también es un antiportador que funciona intercambiando fosfato por OH^-. También hay acarreadores para sustratos oxidables (figura 10-8); éstos también funcionan como antiportadores, ya sea con un OH^- del interior o con un ácido dicarboxílico.

Finalmente, es necesario mencionar que las mitocondrias también poseen un sistema muy activo de transporte de Ca^{2+}. Éste se transporta por medio de un uniportador, o sea que el acarreador de Ca^{2+} pasa al Ca^{2+}, del exterior al interior, sin intercambiarse con alguna molécula o ion (figura 10-8); la fuerza que impulsa el movimiento de Ca^{2+} es el potencial eléctrico que se establece durante el transporte de electrones. Existen datos que sugieren que este acarreador sirve para mantener los niveles de Ca^{2+} citoplásmico dentro de límites fisiológicos, pero varios investigadores consideran que la principal función del acarreador de Ca^{2+} es la de regular los niveles intramitocondriales de Ca^{2+}. Ya que la actividad de algunas de las deshidrogenasas que existen en la matriz mitocondrial dependen de la concentración de Ca^{2+}, la función del acarreador de Ca^{2+} sería la de regular la actividad de dichas enzimas y, en consecuencia, el consumo de oxígeno y la formación de ATP.

El conocimiento de los sistemas de transporte mitocondriales en conjunto con los mecanismos de síntesis de ATP ilustra que la síntesis de ATP

en mitocondrias es un sistema complejo y altamente integrado. Se requiere, obviamente, transporte de electrones y la función de la ATP sintasa, pero también se necesitan sistemas de transporte que son los que proporcionan los sustratos donadores de electrones para la cadena respiratoria, y ADP y fosfato para la ATP sintasa. Además, el transporte de Ca^{2+}, que en última instancia está controlado por los niveles de Ca^{2+} citoplásmico, parece ser un factor de regulación importante del funcionamiento global de las mitocondrias.



Biogénesis

Las mitocondrias tienen en su interior DNA y un sistema de síntesis de proteínas muy activo.

Una de las características más interesantes de las mitocondrias es que en su interior existe DNA y un sistema de síntesis de proteínas muy activo. El DNA mitocondrial, a semejanza del DNA de bacterias, es circular. En comparación con el DNA nuclear, el DNA mitocondrial es relativamente pequeño; solo tiene la información para sintetizar unas cuantas proteínas. Se han identificado las proteínas que se sintetizan en las mitocondrias con la información de su DNA. En las mitocondrias de humano, tres de las subunidades de la citocromo oxidasa, siete de la NADH deshidrogenasa, una del citocromo b y dos de la ATP sintasa son codificadas por el DNA mitocondrial. Ya que las enzimas también tienen subunidades codificadas por el DNA nuclear, los hallazgos implican que la formación de estas enzimas requieren de subunidades que se sintetizan tanto en el sistema nuclear como en el mitocondrial.

De estos hechos surgieron preguntas sobre cómo las proteínas que se sintetizan fuera de las mitocondrias llegan específicamente a las membranas mitocondriales, y cómo es que se internalizan. En los últimos años (Schatz, 1996) se ha visto que las proteínas que se sintetizan en el sistema extramitocondrial tienen un precursor que actúa como señal de reconocimiento para receptores que se encuentran en la membrana interna de las mitocondrias. Una vez que interactúan con el receptor, las proteínas se importan hacia el interior de las mitocondrias en un proceso que es dependiente de energía. También se ha demostrado que, en las mitocondrias, existen enzimas proteolíticas que separan a la proteína de su péptido señal. Una vez separadas de su péptido señal, las proteínas pueden unirse con otras subunidades para formar la enzima catalíticamente activa. Sin embargo, también se ha descubierto que en la formación de la estructura terciaria de las subunidades y su ensamble con otras subunidades intervienen chaperonas. Estas últimas son proteínas que ayudan a que otra proteína adquiera su estructura terciaria; su función es la de combinarse con la proteína, antes de que ésta adquiera su estructura nativa y así impedir la formación de estructuras incorrectas. Todo parece indicar que las proteínas, después de cruzar la membrana, interactúan con chaperonas, después se liberan y finalmente se combinan con otras subunidades para formar la enzima funcional.

Los trabajos sobre la síntesis de las proteínas mitocondriales, principalmente de aquellas que están formadas por subunidades que se sintetizan en

distintos compartimentos, sorprenden tanto por la complejidad del sistema como por el grado de finura de los experimentos. Sin embargo, es claro que aún existen preguntas básicas sobre cómo se internalizan y ensamblan las distintas subunidades que conforman una enzima que está colocada dentro de la membrana con una disposición y orientación precisa. También se tiene una idea clara de cómo se coordina, si es que se coordina, la información entre el DNA nuclear y mitocondrial. Por otro lado, la degradación de las enzimas mitocondriales casi no se ha estudiado.



Mitocondrias y muerte

En este capítulo se ha descrito que los procesos que ocurren en las mitocondrias son necesarios para mantener la vida de las células. Es, por tanto, paradójico que en los últimos años hayan surgido datos muy claros que indican que las mitocondrias también participan en la muerte celular programada, un proceso que se conoce como apoptosis. En las mitocondrias hay varias proteínas que son potencialmente peligrosas. Normalmente, están guardadas. Pero por un proceso de señales, que apenas se empieza a entender, las proteínas se activan y la célula se muere.

En uno de los pasos críticos en este proceso, ocurre una alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Este cambio hace que algunas proteínas del espacio intermembranal se liberen al exterior de las mitocondrias. Algunas de estas proteínas son las llamadas *procaspasas*: el *citocromo c* (un activador de las caspasas), el coactivador de las caspasas llamado *Smac/Diablo* y un factor que induce apoptosis. Este último activa las nucleasas que digieren al DNA. Un artículo reciente sobre el tema es el de Li y cols., 2000.



Perspectivas

Las mitocondrias son unos de los organelos que más se han estudiado. Sin embargo, en la medida en que ha aumentado el conocimiento han surgido nuevos problemas. Uno de éstos es la definición de la estructura tridimensional de las enzimas de la membrana interna de las mitocondrias y los cambios conformacionales que ocurren durante la catálisis; en estos momentos, éste es un campo muy activo de investigación. También se empiezan a visualizar mecanismos insospechados en la transformación de la energía de potenciales electroquímicos de H^+ en la energía química de uniones pirofosfato. El campo de la biogénesis de mitocondrias que se inició hace más de tres décadas con el descubrimiento de que la formación de las mitocondrias sigue patrones no mendelianos ahora se conoce con cierto detalle, pero falta mucho trabajo para entender cómo se ensamblan las proteínas dentro de las membranas y la matriz mitocondrial. Hace unas décadas sólo se conocía un caso en que un defecto mitocondrial había producido enfermedad; ahora se conoce que son varias las enfermedades que resultan de alteraciones en el DNA mitocondrial (González-Halphen y Vázquez, 1995).

También está en pleno desarrollo el problema de la muerte celular programada y cuál es el papel de las mitocondrias en este proceso. Se reconoce que, en la ciencia, la resolución de un problema se acompaña inevitablemente de nuevas preguntas. Las mitocondrias no son la excepción. De hecho, es posible que los primeros 100 años de su historia sean sólo el principio de investigaciones que lleven a la comprensión total de todos los procesos que en ellas ocurren.



Referencias bibliográficas

Abrahams, J.P.; Leslie, A.G.W.; Lutter, R. y Walker, J.E., *Nature,* **370:** 621-628, 1994.

Gómez-Puyou, A.; Ayala, G.; Muller, V. y Tuena de Gómez-Puyou. "Regulation of the Synthesis and hidrolysis of ATP by mitochondrial ATPase. Role of Mg^{2+}", *J. Biol. Chem*., **22:** 13673-13679, 1983.

González-Halphen, D. y Vázquez Acevedo, M., "Las enfermedades mitocondriales", *Mensaje Bioquímico XIX,* 61-93, 1995.

Kalchar, H.M., "Biological Phosphorylations", *Development of Concepts,* Prentice Hall, Englewood Cliffs, Nueva Jersey, 1969.

Li, H.; Kumar Colluri, S.; Gu, J.; Dawson, M.I.; Cao, X.; Hobbs, P.D.; Lin, B.; Chen, G.; Lu, J.; Lin, F., Xie, Z.; Fontana, J.A.; Reed, J.C. y Zhang, X., "Cytochrome C release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3", *Science,* **289:** 1159-1164, 2000.

Mitchell, P., "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism", *Nature,* **191:** 144-148, 1961.

Nicholls, D.G., "Bioenergética", *Introducción a la Teoría Quimiosmótica,* Editorial Reverté, Barcelona, 1987.

"Proton Motive ATPases", *J. Exp. Biol.,* **203:** 1-170, 2000. (Número especial.)

Pullman, H.S.; Pullman, M.E.; Datta, A. y Racker, E., "Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. II Participation of a soluble Adenosine Triphosphatase in oxidative phosphorylation", *J. Biol. Chem.,* **235:** 3330-3336, 1960.

Schatz, G., "The Protein Import System of Mitochondria", *J. Biol. Chem.,* **271:** 317 63-31766, 1996.

Tuena de Gómez-Puyou, MT. Muller, U.; Dreyfus, G.; Ayala, G. y Gómez-Puyou, A., "Regulation of the synthesis and hidrolysis of ATP by mitochondrial ATPase, role of the natural APPase inhibitor protein", *J. Biol. Chem.* **258:** 13680-13684, 1983.

———, M.; García, J.J. y Gómez-Puyou, A., "Synthesis of Pyrophosphate and ATP by Soluble Mitochondrial F1", *Biochemistry,* **32:** 2213-2218, 1993.

CAPÍTULO 11

EL CLOROPLASTO

Patricia León Mejía



Generalidades

Todas las células de eucariontes contienen entidades subcelulares rodeadas de membrana que pueden ser aisladas independientemente, como son el núcleo, la mitocondria, los lisosomas, las vacuolas, los peroxisomas, etc. Los organismos fotosintéticos, a excepción de algunas células espermáticas en angiospermas, en adición a los anteriores presentan organelos semiautónomos llamados plástidos. Excluyendo a las vacuolas, los plástidos son los organelos más grandes de las células vegetales y no presentan una posición fija dentro de la célula, sino que pueden migrar de un lugar a otro. Los plástidos están rodeados por una doble membrana que constituye la envoltura del organelo y contienen, al igual que la mitocondria, un genoma propio, también conocido como nucleoide. Este genoma aparece como fibras en el interior del organelo y puede variar en número, dependiendo del tipo de plástido y de las condiciones externas. El interior de los plástidos contiene una matriz conocida como el estroma, donde se encuentra tanto el nucleoide como la maquinaria de replicación, transcripción y traducción de estos organelos. En algunos casos, la membrana interna de estos organelos prolifera y se invagina, formando estructuras características.

> Los plástidos están rodeados por una doble membrana que constituye la envoltura del organelo y contienen, al igual que la mitocondria, un genoma propio.

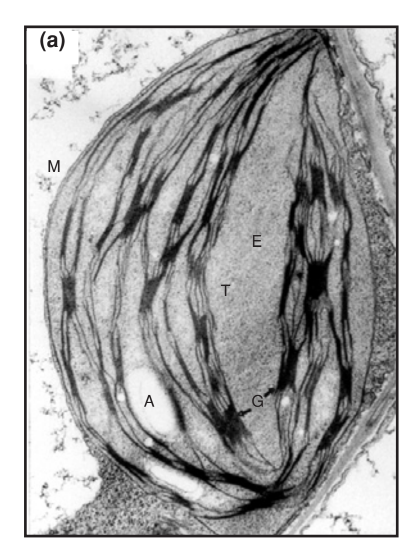


Tipos de plástidos

Las plantas superiores contienen una gran variedad de plástidos y en ellos se realizan funciones esenciales para el desarrollo y la funcionalidad de las plantas. Estos organelos presentan diferencias en tamaño, ultra estructura, actividad bioquímica y función. Todos ellos derivan de un plástido común y, en consecuencia, están relacionados durante el desarrollo (Kirk y Tilney-Bassett, 1978). Las diferencias estructurales y funcionales que presentan se correlacionan con cambios importantes en la expresión genética de las células que los contienen. Inicialmente, estos organelos fueron clasificados de

acuerdo con su apariencia física, en especial su color. Así, se definieron los cloroplastos (plástidos verdes), los cromoplastos (plástidos amarillos, anaranjados o rojos) y los leucoplastos (plástidos sin color). Actualmente, esta clasificación ha sido modificada incluyendo aspectos funcionales de cada uno de estos organelos. Los principales tipos de plástidos reconocidos actualmente son:

1. Cloroplastos. Estos plástidos están presentes predominantemente en hojas y tejido verde; la presencia de altas concentraciones de clorofila les da su apariencia verde característica de donde deriva su nombre. Su función está relacionada con la captación de energía solar y la fijación de carbono atmosférico durante el proceso conocido como fotosíntesis. Los cloroplastos son probablemente los plástidos más importantes en biología y los más estudiados, ya que representan la entrada primaria de energía a la biósfera y sin los cuales la vida humana sería imposible. En forma característica, estos organelos contienen una gran cantidad de membrana interna que se conoce como membrana tilacoidea y que les da una apariencia muy distintiva (figura 11- 1a). Esta membrana tilacoidea presenta un arreglo elaborado de interconexiones con sacos membranosos en forma de disco que se apilan entre sí, formando lo que se conoce como *grana* (figura 11-1a).
2. Los amiloplastos. Estos plástidos están presentes primordialmente en tejidos de reserva, en meristemos y en la cofia de la raíz. La mayor parte del volumen interno de estos plástidos se encuentra lleno de almidón y carece de clorofila (figura 11-1b). Este tipo de plástidos presenta sólo unas cuantas prolongaciones de la membrana interna. La función principal de estos organelos puede variar, dependiendo del tejido al que se asocia; por ejemplo, en tejidos como el endospermo, los cotiledones y los tubérculos, su función es almacenar almidón (Thomson y Whatley, 1980). En



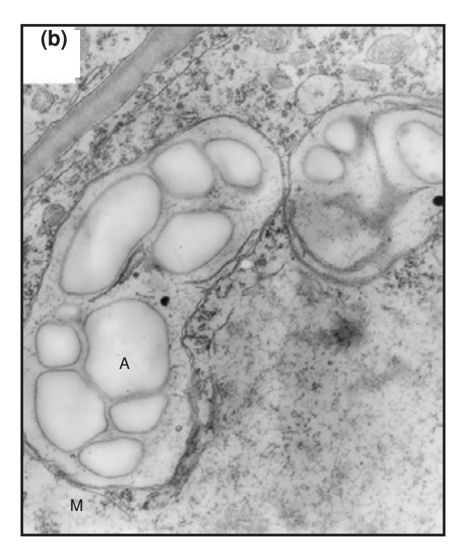


Figura 11-1. a) Microscopia electrónica del cloroplasto. M, membrana del cloroplasto; T, membranas tilacoideas, G, *grana* E, estroma y A, granos de almidón. **b)** Microscopia electrónica del amiloplasto. M. membrana del amiloplasto y A. gránulos de almidón.

contraste, en la cofia de la raíz, su función es muy particular y se ha asociado con la percepción gravitrópica de las plantas. Los granos de almidón presentes en los amiloplastos de células especializadas, presentes en la cofia de la raíz, conocidas como estatolitos, parecen ser responsables de percibir la fuerza de gravedad y orientarse hacia ella. Esta señal posteriormente es transmitida a otras células de la raíz, donde se lleva a cabo un crecimiento celular diferencial que dará como resultado la curvatura en la raíz hacia donde se encuentra la fuerza de gravedad. Se conoce poco de los eventos moleculares de la respuesta gravitrópica, pero resulta sumamente intrigante la función que realizan los amiloplastos en este fenómeno (Feldmann, 1985). En la actualidad, se cuenta con mutantes que presentan respuestas gravitrópicas alteradas y que probablemente serán sumamente útiles para entender con más detalle este fenómeno. Se ha observado que, en algunas de estas mutantes, los amiloplastos son aberrantes y no contienen almidón, lo que apoya directamente la participación directa de este organelo en el gravitropismo.

3. Cromoplastos. Este término se usa para los plástidos que almacenan compuestos denominados carotenos, pigmentos responsables de los colores amarillo, anaranjado y rojo en pétalos de flores, frutos y raíces de plantas superiores. La función precisa de estos organelos no se conoce, aunque comúnmente se cree que actúan como atrayentes para animales y que son el resultado de una coevolución entre plantas y polinizadores. Los cromoplastos pueden presentar diferentes formas, de las cuales la más frecuente es una forma ameboide. Dependiendo del arreglo que presentan los carotenos dentro del cromoplasto, han sido clasificados en cuatro grupos diferentes que son: globulares, tubulares, membranosos y cristalinos. Los cromoplastos, como se verá más adelante, pueden provenir a partir de cualquier otro tipo de plástido. En una gran cantidad de plantas, los cromoplastos provienen de cloroplastos presentes en las flores y frutos verdes. Esta diferenciación involucra una degradación masiva de las membranas tilacoideas, de la clorofila y de los complejos fotosintéticos. En forma paralela existe una acumulación de proteínas específicas que constituyen componentes estructurales de estos organelos, denominados fibrilinas. También existen evidencias que sugieren que los cromoplastos pueden diferenciarse hacia amiloplastos o desdiferenciarse hacia proplástidos (Thomson y Whatley, 1980).
4. Oleinoplastos. Se conoce con este nombre a los plástidos que acumulan aceites. Estos organelos no están presentes en todo tipo de plantas, sino que se encuentran, generalmente, en las células epidérmicas de algunas monocotiledóneas y de algunas dicotiledóneas que carecen de la acumulación de almidón en la semilla.
5. Proteinoplastos. Con éste término se conocen los plástidos que almacenan proteínas. Estas proteínas se acumulan como inclusiones cristalinas o amorfas dentro del organelo y están usualmente limita-

das por membranas. Los proteinoplastos pueden encontrarse en tipos celulares diferentes y el tipo de proteínas que contienen parece también variar, dependiendo del tejido. Se ha reportado la presencia de enzimas como peroxidasas, polifenol oxidasas, así como algunas lipoproteínas, como los constituyentes mayoritarios de los proteinoplastos. Se piensa que estas proteínas pueden funcionar como material de reserva en la formación de nuevas membranas durante el desarrollo del plástido; sin embargo, existen algunas evidencias que indican que estas reservas podrían ser usadas para otros propósitos (Thomson y Whatley, 1980).

6. Proplástidos. Se usa este término para designar a una variedad de plástidos pequeños no diferenciados que se encuentran principalmente en las células meristemáticas de las raíces y tallos. Algunos autores les denominan eoplastos, e incluso los subdividen en grupos específicos. En este tipo de plástidos no se distinguen estructuras bien definidas, sino que constan de una matriz relativamente homogénea y algunas vesículas aisladas provenientes de la membrana interna. Se cree que estos plástidos son los precursores directos de todos los demás tipos de plástidos. En muchas ocasiones, la rediferenciación de algunos plástidos maduros requiere de la reformación de proplástidos; tal es el caso del desarrollo del polen y la maduración de la semilla.
7. Etioplastos. Con este término se conocen los plástidos que se encuentran en los cotiledones o en las hojas de plantas crecidas en la oscuridad. Los etioplastos se diferencian rápidamente hacia cloroplastos, al ser expuestos a la luz, y se caracterizan por presentar una estructura membranal interna denominada sistema paracristalino. El sistema paracristalino irradia de estructuras denominadas centros cristalinos o cuerpos prolamelares. Se sabe que la composición de esta estructura está dada por lípidos y proteínas; estas últimas constituyen aproximadamente un 25% del contenido total. La proteína predominante es la NADPH: protoclorofila oxidorreductasa, la cual es una enzima que participa en los últimos pasos de la biosíntesis de la clorofila, pigmento indispensable para que se realice la fotosíntesis. La acumulación de esta enzima permite que la clorofila se sintetice rápidamente, una vez que estos organelos quedan expuestos a la luz.

Además de las funciones particulares características de cada plástido, como se mencionó anteriormente todos ellos realizan funciones esenciales para el desarrollo vegetal, como son la síntesis de algunos de los pasos de la biosíntesis de hormonas vegetales como el ácido abscísico y las giberelinas; y la biosíntesis de lípidos y la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios, como son los compuestos derivados de la biosíntesis de isoprenoides los cuales desempañan funciones diversas para la planta. Muchos isoprenoides producidos en los plástidos son compuestos de gran importantancia para la industria alimenticia, farmacéutica e industrial; tal es el caso las vitaminas A y E; anticancerígenos como el taxol; de polímeros

como el hule, aceites escenciales, ceras, pigmentos y fragancias por mencionar algunos ejemplos.



Desarrollo de los plástidos: comunicación núcleo-cloroplasto

Los estudios de microscopia desde el siglo pasado han permitido concluir que los plástidos provienen de la división de plástidos preexistentes y son trasmitidos de una célula a las células hijas durante la división celular (Green, 1964; Schimper, 1885). En la mayor parte de las angiospermas, los plástidos se heredan en forma materna, ya que la mayoría de las células espermáticas carecen de ellos. Hasta el momento, no se sabe a ciencia cierta el mecanismo de segregación de estos organelos, aunque se ha observado que, durante la fase de división, los plástidos parecen asociarse a la membrana nuclear, asegurando de esta manera su segregación.

En la mayoría de las angiospermas, los plástidos se heredan en forma materna.

En 1960, se sugirió que todos los plástidos provenían de proplástidos presentes en las células meristemáticas y que, potencialmente, los diferentes plástidos se encuentran relacionados entre sí. Más recientemente, basado en estudios de microscopia electrónica Whatley propuso un modelo de la vía de interrelación del desarrollo de los plástidos (Whatley, 1978). En este modelo se proponen siete estadios de desarrollo, como se ve en la figura 11-2.

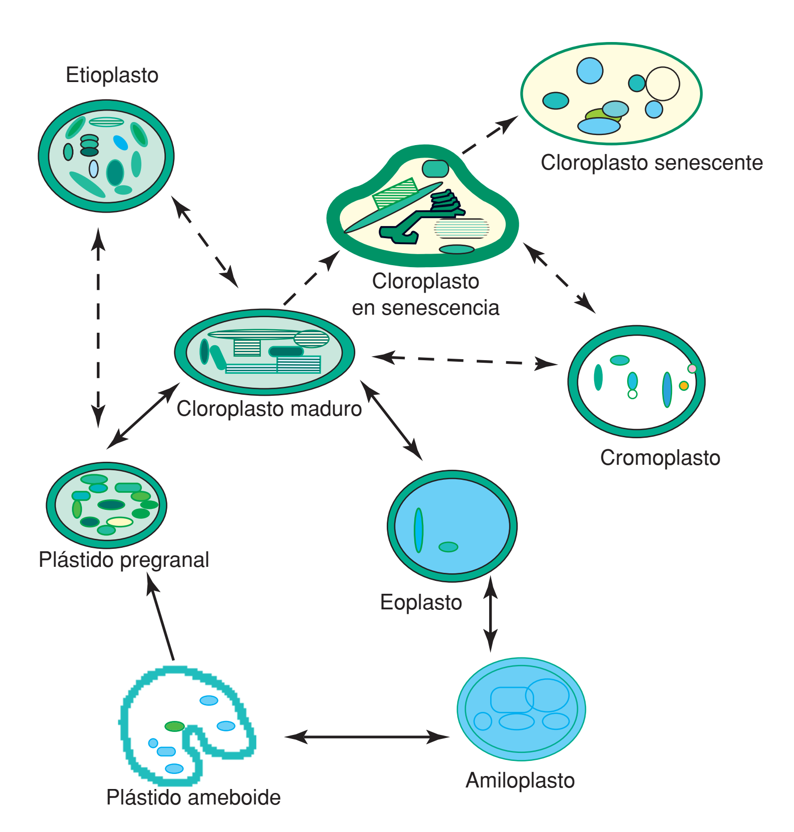


Figura 11-2. Ciclo del desarrollo de cloroplastos, propuesto por Whatley en 1978. Los diferentes plástidos provienen de un plástido no diferenciado denominado proplástido o eoplasto. Las flechas indican que los diferentes plástidos pueden interconvertirse entre sí, dependiendo de las condiciones externas. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

Los tres primeros corresponden a lo que se conoce como los estadios preliminares de los proplástidos no verdes, incluyendo al amiloplasto; posteriormente, se encuentran el estadio del plástido pregranal, el cual puede ser verde o no verde y del que el etioplasto es una variante; los cloroplastos maduros, que son fotosintéticamente activos, y finalmente los gerontoplastos o cloroplastos senescentes, presentes en los tejidos en senescencia. Durante las etapas iniciales de la diferenciación de la hoja, se ha propuesto que existen fluctuaciones repetidas entre los estadios de los plástidos no verdes, pero aún no se conoce a ciencia cierta el porqué de estas repeticiones.

Fuertes evidencias experimentales apoyan la idea de que también existe re-diferenciación y desdiferenciación entre plástidos, es decir, que los plástidos presentes en el tejido inicial (raíz, hoja, etc.) sean capaces de rediferenciarse y dar origen a todos los otros tipos de plástidos. Este hecho es indispensable durante la maduración de flores y frutos o en cultivo de tejidos, donde se ha observado que, a partir de un solo tipo celular, se da origen a otros tejidos, órganos e incluso a una planta completa.

Los eventos de diferenciación de los plástidos dependen del tipo celular y responden a un programa de desarrollo tejido-específico. Así, en algunos tejidos como la raíz, se propone que el proceso de diferenciación es bloqueado en el estado de amiloplastos, impidiendo su diferenciación hacia cloroplastos u otras formas plastídicas (Thomson y Whatley, 1980). El control de la diferenciación plastídica temprana es aún totalmente desconocido, al igual que los elementos involucrados en dicha diferenciación. Varios factores tanto internos como externos están involucrados en este proceso, entre los que se encuentran la luz, nutrientes, niveles hormonales, etc. (Clowes y Juniper, 1968; Kirk y Tilney-Bassett, 1978.) Todos éstos promueven directa o indirectamente la producción de señales regulatorias provenientes del núcleo, las cuales afectan el desarrollo de los plástidos, por lo que está claro que el núcleo juega un papel central en la diferenciación de estos organelos. Tal vez, la señal más estudiada hasta el momento es la luz, ya que la diferenciación de cloroplasto requiere de ella y, en su ausencia, los plástidos en desarrollo son incapaces de realizar los últimos estadios de diferenciación quedando como etioplastos. En estos estadios se requiere la participación de varios reguladores negativos nucleares, los cuales impiden el desarrollo de cloroplastos en ausencia de luz. El análisis de una gran variedad de mutantes que afectan el proceso de diferenciación de los plástidos demuestra claramente que el núcleo regula en forma directa el desarrollo de los plástidos (Wei y Deng, 1996; León y cols., 1998).

Existen evidencias claras de que los plástidos son también capaces de señalizar al núcleo su estado de diferenciación y, de esta manera, establecer un diálogo entre el núcleo y los plástidos. La señalización del plástido hacia el núcleo ha sido primordialmente estudiada en los cloroplastos, donde se ha encontrado que existe regulación de la transcripción de genes nucleares que codifican para proteínas las cuales se localizan en los plástidos por el estado de desarrollo del cloroplasto. Se ha observado que mutaciones que impiden la funcionalidad de los cloroplastos, por ejemplo, debido a un bloqueo en la acumulación de pigmentos (carotenos), provocan que la expresión de varios genes fotosintéticos nucleares se inhiba (Susek y Chory, 1992). Más

recientemente, se ha sugerido que la señalización entre cloroplasto y núcleo se lleva a cabo en diferentes momentos del desarrollo del organelo (León y cols., 1998). Hasta el momento, poco se conoce de las posibles moléculas que lleven a cabo esta señalización. Se ha sugerido que pudieran ser sRNAs o bien el producto de algún proceso metabólico. Datos muy recientes sugieren a las profilinas, que son moléculas precursoras de las clorofilas, como posibles señales (Susek y Chory, 1992).



Origen de los plástidos

Los plástidos de plantas superiores contienen un genoma propio de aproximadamente 120 a 260 kpb.

Los plástidos de plantas superiores contienen un genoma propio de aproximadamente 120 a 260 kpb. Este genoma es capaz de codificar para un número limitado de genes, por lo que muchas de las proteínas plastídicas estan codificadas en el núcleo, traducidas en el citoplasma e importadas al cloroplasto. La presencia de DNA en los plástidos, junto con la existencia de una doble membrana, han permitido hipotetizar que estos organelos, al igual que la mitocondria, provienen de una endosimbiosis con organismos de vida libre (Gray y Doolittle, 1982). El organismo más aceptado como posible endosimbiote para el caso de los plástidos son bacterias relacionadas con las bacterias verde-azules o cianobacterias. Esta teoría se ha visto sustentada por múltiples evidencias como son; las características procariónticas que presentan a nivel estructural los diferentes genes en el cloroplasto, así como por la similitud de los mecanismos moleculares de la regulación, división y transcripción entre los plástidos y las bacterias actuales.

Actualmente, los plástidos han perdido la capacidad de permanecer en vida libre, y son incapaces de replicarse y sobrevivir por tiempos largos fuera de la célula. Esto implica que una gran cantidad de sus funciones básicas dependan del importe continuo de proteínas citoplasmáticas hacia el plástido. Se piensa que durante la evolución, han ocurrido cambios importantes que han provocado una interdependencia total entre los plástidos y el núcleo. Estos cambios en gran medida se deben, presumiblemente, a que la mayoría de los genes requeridos para funciones básicas de los plástidos, como son la biosíntesis de membranas, la transcripción, la replicación y la traducción, se han perdido de los organelos y han sido transferidas al núcleo. Por ejemplo, todas las enzimas requeridas para la biosíntesis de clorofila y carotenos, que son pigmentos indispensables para el funcionamiento del cloroplasto durante la fotosíntesis, están codificadas en el núcleo de las plantas. Se piensa que, inicialmente la mayoría de estos genes se encontraban localizados exclusivamente en el genoma del cloroplasto, y con el paso del tiempo, han sido translocados al núcleo y se han perdido del genoma plastídico. Es importante remarcar que, paralelamente con el cambio de localización de estos genes, debió de haber ocurrido un cambio en los circuitos de regulación de los mismos, adquiriendo las señales eucariónticas necesarias para su expresión. En específico, se trata tanto de los elementos básicos de transcripción como de elementos necesarios para la regulación durante el desarrollo de la planta en órganos y tejidos específicos.

En contraste con lo descrito en el párrafo anterior, algunas funciones características de los plástidos actuales no están presentes en procariontes fotosintéticos de vida libre. Es posible suponer que estas funciones fueron adquiridas en una etapa posterior al proceso de endosimbiosis, como una respuesta a nuevas presiones evolutivas. Como ejemplo, se encuentran las funciones relacionadas con la biosíntesis de las hormonas vegetales, la biosíntesis y almacenaje de los lípidos y del almidón, así como la biosíntesis de algunos compuestos como atractores para la polinización y para respuesta a ataque de pátogenos (Mullet, 1990).

Estructura del cloroplasto

Hasta el momento, el plástido más estudiado es el cloroplasto donde se realiza la fotosíntesis. Aunque no es el objetivo de este capítulo describir en detalle el proceso fotosintético, es importante remarcar que las funciones fotosintéticas comprenden tanto la conversión de la energía luminosa en energía química como la fijación del CO_2 atmosférico en moléculas carbonadas. Ambas funciones comprenden el proceso fotosintético y se dividen en fases luminosa y oscura de la fotosíntesis, respectivamente.

La mayoría de los cloroplastos se encuentra en los tejidos verdes, en especial en las hojas. Sin embargo, no todas las células de las hojas contienen cloroplastos, sino que estos organelos están restringidos al tejido fotosintético, también conocido como tejido del mesófilo, y están ausentes en tejidos como la epidermis y la cutícula, a excepción de las células estomáticas, las cuales sí contienen cloroplastos. En plantas como el maíz, que realizan una derivación del proceso fotosintético denominado fotosíntesis tipo C4, el tejido fotosintético está constituido por dos tipos celulares, conocidos como células del mesófilo y células del parénquima vascular. En este tipo de plantas, hay una acumulación de cloroplastos en ambos tipos de células, aunque existen diferencias notables en el fenotipo de cada uno de estos organelos. En plantas como el maíz el desarrollo de los cloroplastos va acoplado al desarrollo del tejido fotosintético; de esta manera es posible distinguir en una hoja un gradiente progresivo de diferenciación entre los cloroplastos entre las células más jóvenes o las más viejas. Este gradiente se ve reflejado no sólo a nivel estructural, sino también a nivel bioquímico, de tal manera que los cloroplastos con mayor capacidad fotosintética se encuentran concentrados en las células maduras de la hoja (Langlade y cols., 1988).

Como se mencionó en párrafos anteriores, los cloroplastos al igual que otro tipo de plástidos, derivan de proplástidos no diferenciados. Durante el proceso de diferenciación hacia cloroplasto, existe una gran proliferación de la membrana interna, de modo que se forma lo que se conoce como tilacoides. Inicialmente, los tilacoides derivan de la invaginación de la membrana interna; sin embargo, a medida que los cloroplastos maduran, los tilacoides aumentan en número, a partir de la proliferación de los tilacoides iniciales. La membrana tilacoidea sufre un arreglo complejo formando sacos en forma de discos que se apilan unos

> La membrana tilacoidea sufre un arreglo complejo formando sacos en forma de discos que se apilan unos con otros y que se conocen como *grana*.

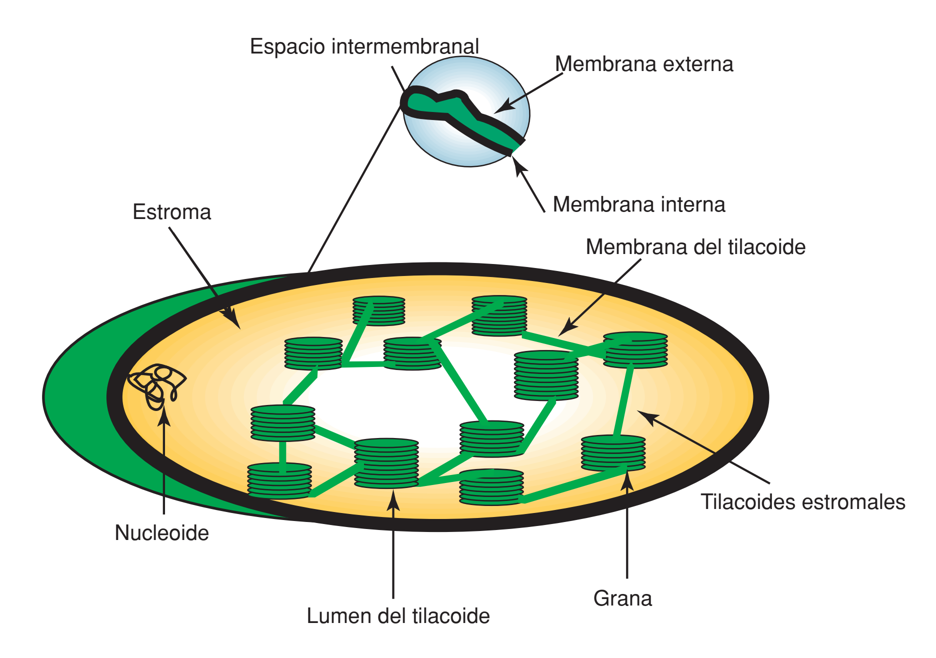


Figura 11-3. Compartimentos subcelulares del cloroplasto. El cloroplasto está formado por tres compartimentos membranales; membrana externa, interna y tilacoidea, y por dos compartimentos solubles, estroma y lumen del tilacoide. En el estroma se encuentran las proteínas de transcripción, replicación y duplicación, así como el DNA del organelo; el nucleoide. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

con otros y que se conocen como *grana*. Estos sacos están interconectados por membranas tilacoideas conocidas como tilacoides estromales. El espacio que se forma dentro de este sistema membranal se conoce como lumen. El sistema tilacoideo parece ser una vesícula gigante interconectada con un lumen continuo (figura 11-3). Insertados en la membrana tilacoidea se encuentran el aparato fotoquímico, formado por las proteínas involucradas en la captación de la energía luminosa y su conversión a energía química, así como los pigmentos asociados a estos complejos, carotenos y clorofilas. Estos complejos forman lo que se conoce como los fotosistemas y realizan la llamada fase luminosa del proceso fotosintético. En plantas superiores encontramos dos fotosistemas (fotosistema I y II), cada uno de los cuales contiene tanto pigmentos (clorofilas y carotenos) como una serie de proteínas características, capaces de transferir electrones. Estos fotosistemas no se encuentran distribuidos en forma fortuita, sino que, en general, guardan una localización específica; así, el fotosistema I se encuentra mayoritariamente en las regiones no apiladas de los tilacoides (tilacoides estromales), mientras que el fotosistema II, en el *grana*. Esta distribución a la que se conoce como simetría lateral de hecho, esta regulada por las condiciones del proceso fotosintético. Otros de los elementos insertados en la membrana tilacoidea son el complejo proteico involucrado en la síntesis de ATP, la ATPasa o ATP sintetasa y el complejo de citocromos. En ambos casos, la mayoría de las subunidades proteicas de estos complejos están insertadas en la membrana (Lawlor, 1993).

> Los fotosistemas realizan la llamada fase luminosa del proceso fotosintético.

> El fotosistema I se encuentra mayoritariamente en las regiones no apiladas de los tilacoides (tilacoides estromales), mientras que el fotosistema II, en el *grana*.

La fijación del carbono, también conocida como fase oscura, ocurre en el estroma o fase soluble del cloroplasto (figura 11-3). Estas reacciones

> En el estroma encontramos las enzimas involucradas en estas reacciones químicas, de las cuales la más abundante es la enzima RUBISCO, y de hecho, es la proteína más abundante en la naturaleza.

promueven la formación de triosa fosfato que, en muchos casos, es convertida a almidón. Por lo tanto, en el estroma encontramos las enzimas involucradas en estas reacciones químicas, de las cuales la más abundante es la enzima RUBISCO (Ribulosa 1-5 Bi-fosfato carboxilasa/oxigenasa) (Woodrow, 1988). Esta enzima, encargada de carboxilar a la ribulosa bifosfato, como se ve en la siguiente reacción, puede constituir hasta 50% de la proteína soluble en hojas, y de hecho, es la proteína más abundante en la naturaleza (Lawlor, 1993).

$$RuBP + CO_2 \longrightarrow PGA$$



Organización del genoma del cloroplasto. Estructura del genoma

> El DNA plastídico se localiza en la matriz.

Como se mencionó, el DNA plastídico se localiza en la matriz, pero estas moléculas en su mayoría están asociadas a la membrana interna o a las membranas tilacoideas en multicopia con agregados que van de 10 a 20 moléculas por agregado. El número de genomas varía con el estado de desarrollo del organelo, desde 22 en la mayoría de los plástidos poco diferenciados hasta 1,000 copias por organelo, en los cloroplastos maduros. La estructura del genoma plastídico no ha sido extensamente estudiada; pero hasta donde se sabe parece semejante a la estructura genómica en bacterias con la ausencia de histonas. La duplicación de este genoma se realiza en diferentes momentos del ciclo celular y no parece estar restringida a una fase específica. Las moléculas de DNA en el organelo que son duplicadas parecen ser escogidas al azar, por lo que podría suponerse que algunas de ellas son replicadas más de una vez y otras incluso ninguna. A pesar de ello, el proceso de replicación está claramente regulado y esto asegura que el número de genomas sea constante en cada tipo de tejido.

El DNA de los plástidos es en su mayoría una molécula circular pequeña y relativamente simple, que varía entre 120 y 217 kpb, dependiendo de la especie. Considerando diferentes especies vegetales, el genoma del cloroplasto es, en comparación con el genoma mitocondrial vegetal, muy homogéneo en cuanto a su tamaño. Existen, sin embargo, reportes de variaciones en el tamaño del genoma plastídico para algunas especies; como ejemplo, el alga verde *Siphonous* (*Codium fragile*), la cual tiene el tamaño más pequeño conocido hasta la fecha (85 kpb), mientras que *Chlamydomonas moewusii* tiene el más grande (292 kpb). Una característica del genoma de los plástidos es la presencia de una invertida repetida entre 6 a 76 kpb. De hecho, la mayoría de las diferencias en tamaño encontradas hasta el momento se deben, principalmente, al tamaño y a la presencia de esta secuencia invertida repetida, ya que ésta duplica una porción del genoma. La localización de esta duplicación es relativamente fija y comprende genes como los que codifican para los RNA ribosomal (rRNA). Ésta duplicación está ausente en el genoma de algunas plantas como el chícharo,

la alfalfa y el pino. Se ha postulado que secuencias invertidas repetidas estaban presentes en el ancestro común de las plantas terrestres y que éstas se han perdido en algunas especies durante la evolución. Estudios recientes han demostrado que algunos organismos como *Euglena gracilis* contienen tres repetidas en tándem, de una parte del genoma, cada una de las cuales contiene el conjunto de genes para rRNA; sin embargo, este tipo de conformación es realmente poco usual. A pesar de la homogeneidad en cuanto a tamaño, el orden de los genes cloroplásticos puede variar entre diferentes especies y esto se debe principalmente a inversiones de ciertas regiones originadas por secuencias invertidas de menor tamaño, presentes en el genoma plastídico. Estos rearreglos en general no afectan el número de genes codificados en esta molécula y sólo alteran el orden de varios genes. Tal vez, la mayor variabilidad en el orden genético se ha descrito en el chícharo, donde se han reportado por lo menos 12 rearreglos (Palmer, 1885).

El genoma cloroplástico ha sido totalmente secuenciado en plantas como el tabaco. Se sabe que codifica para aproximadamente 123 genes, cuya función puede ser dividida en dos categorías generales: genes involucrados en la fotosíntesis y genes requeridos para la manutención del organelo (tabla 11-1). El DNA del cloroplasto codifica para todos los genes rRNAs, la mayoría de los sRNA de transferencia (tRNAs), proteínas ribosomales y subunidades de los genes de la RNA polimerasa específica de estos organelos. Es interesante que genes con homología a factores de traducción han sido encontrados en el DNA del cloroplasto en *Euglena*, pero en ninguna planta terrestre. Sin embargo, aún existen aproximadamente 18 fases de lectura cuya función no ha sido identificada.

El genoma cloroplástico ha sido totalmente secuenciado en plantas como el tabaco.



Regulación de la expresión de genes cloroplásticos

Durante el desarrollo del cloroplasto, a partir de proplástidos, tanto los niveles de muchas proteínas como de sus respectivos sRNA mensajeros se incrementan en forma notable, en muchos casos, a partir de niveles inicialmente indetectables. Este proceso, como se mencionó, responde a señales tanto de desarrollo como medio ambientales, y trae como consecuencia el fenómeno de enverdecimiento de los tejidos fotosintéticos. Está bien establecido que tanto factores transcripcionales como factores postranscripcionales son componentes claves en determinar los niveles de mRNAs en sistemas biológicos. En el caso del cloroplasto, por largo tiempo existió un debate sobre cuál de estos dos mecanismos jugaba el papel más importante para regular la acumulación de mensajeros en el organelo. Actualmente, tomando ventaja de que se conoce la secuencia completa del genoma cloroplástico de varias plantas y el desarrollo de sistemas de transcripción *in vitro*, ha sido posible examinar a nivel molecular el papel que juegan la regulación transcripcional y postranscripcional en los cambios de los niveles de mRNAs durante diferentes estadios del desarrollo del organelo.

Tabla 11-1. Genes codificados en el DNA cloroplástico.

	Productos genéticos
I. Genes requeridos para la manutención del organelo	
Transcripción	
rpo A, B, C1, C2	Subunidades α, β, β' y β'' de la RNA polimerasa
matK	Maturasa
Traducción	
rDNA	RNAs ribosomales 16S, 32S, 4.5S, 5S
trn (30 genes)	RNAs de transferencia
rps (13 genes)	proteínas de la subunidad 30S ribosomal
rpl (9 genes)	proteínas de la subunidad 50S ribosomal
infA	Factor de iniciación I, posible factor de secreción
II. Genes involucrados en la fotosíntesis	
rbcL	Subunidad grande de Rubisco
psaA, psaB, psaJ	Subunidades del FSI
psaC	Proteína Fe-S del FSI de 9 kD
psbA, psbD	Apoproteínas del centro de reacción del FSII
psbB, psbC	Apoproteínas de clorofila del FSII 47 y 43 kD
psb J, psbL, psbN, psbT	Proteínas FSII
psbH	Fosfoproteína del PSII, 10 kD
psbE-psbF	Citocromos 559 del FSII
atp A, B, E, F, H, I	Subunidades de la ATP sintetasa
petA, petB, petD, petG, petL	Subunidades del complejo de citocromos
ndh A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K	Subunidades de la NADH deshidrogenasa
ycf	Proteínas de biogénesis de citocromo C
18 ORFs hasta 100 a.a	Proteínas hipotéticas de función no identificada
III. Genes involucrados en la fotosíntesis	
Transcripción	
rpo A, B, C	Subunidades α, β, β', de la RNA polimerasa
Traducción	
rDNA	RNAs ribosomales 16S, 32S, 4.5S, 5S
trn (30 genes)	RNAs de transferencia
rps (12 genes)	Proteínas de la subunidad 30S ribosomal
rpl (7 genes)	Proteínas de la subunidad 50S ribosomal
infA	Factor de iniciación I, posible factor de secreción
IV. Genes requeridos para la manutención del organelo	
rbcL	Subunidad grande de rubisco
psaA, psaB	Apoproteínas de 80-85 kD del PSI
psaC	Proteína Fe-S del PSI de 9 kD
psbA, psbD	Apoproteínas del centro de reacción del PSII 32-34 kD
psbB, psbC	Apoproteínas de clorofila del PSII 47 y 43 kD
psbE-psbF	Citocromo 559 del PSII
psbH	Fosfoproteína del PSII, 10 kD
atp A, B, E, F, H,I	Subunidades de la ATP sintetasa
18 ORFs hasta 100 a.a	Función no identificada
18 ORFs de más de 100 a.a	Función no identificada

FS: Fotosistema; ORF: Fase de lectura abierta no identificada



Regulación transcripcional

A nivel transcripcional, el estudio de la región regulatoria en los genes del cloroplasto ha revelado que su estructura es muy semejante a la organización procariónica. La mayoría de estos genes presentan secuencias conservadas en *cis*, con homología a las secuencias de tipo bacteriano, que son necesarias para la iniciación de la transcripción de estos genes. Así, se han identificado elementos conservados en las regiones de –10 (TATAAT) y –35 (TTGACA) en lo que constituye la región promotora; la importancia de estos elementos para la transcripción se ha demostrado a través de deleciones y mutaciones específicas (Mayfield y cols., 1995). Algunos genes, sin embargo, carecen de estos elementos; por ejemplo, varios tRNAs cloroplásticos parecen ser capaces de transcribirse en ausencia de elementos en el 5' regulatorios, lo que recuerda a la transcripción de tRNAs nucleares. El análisis de uno de los transcritos provenientes del gen que codifica para una de las subunidades de la ATPasa (*atpB*) de espinaca ha revelado que una secuencia similar a la caja TATA de genes nucleares es crítica para la transcripción de dicho gen. Estos ejemplos sugieren que existen múltiples elementos que parecen gobernar la transcripción en plástidos. Estudios recientes han permitido confirmar la existencia de más de una RNA polimerasa involucrada en la transcripción plastídica (Gruissem y cols., 1988). Se sabe que, por lo menos, algunas subunidades de ambas polimerasas están codificadas en el núcleo, con lo que éste regula directamente la transcripción en plástidos. En algunos casos particulares, se ha observado que elementos adicionales a la secuencia promotora pudieran tener un efecto sobre la transcripción. Tal es el caso de la región regulatoria del gen *atp B*, en el cual se ha visto que secuencias hacia abajo de la iniciación de la transcripción se requieren para tener altos niveles de transcrito (Mayfield y cols., 1995).

El análisis de la eficiencia trascripcional de diferentes genes cloroplásticos ha mostrado que los niveles de transcripción pueden variar hasta en 50 veces entre dichos genes. Se ha observado que regiones hacia abajo del inicio de la transcripción juegan un papel importante en estas variaciones, tal vez actuando como aumentadores o represores transcripcionales. Estos datos han demostrado que existen diferencias en la fuerza de los promotores cloroplásticos, y que éste es uno de los controles para su expresión diferencial (Mayfield y cols., 1995). Estas diferencias, sin embargo, no son suficientes para explicar las grandes variaciones en los niveles de algunos mRNAs que se detectan durante la maduración del cloroplasto, lo que sugiere que otros niveles de regulación, como el postranscripcional, pueden jugar un papel importante en el cloroplasto.



Regulación postranscripcional

A pesar de la existencia de aproximadamente 120 genes codificados en el genoma del plástido, existen solamente alrededor de 50 unidades transcripcionales independientes, ya que la mayoría de estos genes son cotranscritos como unidades policistrónicas. Se ha observado que, durante el desarrollo y diferenciación de los plástidos, la frecuencia relativa del inicio de la transcripción en

> Hay 120 genes codificados en el genoma del plástido, y existen solamente alrededor de 50 unidades transcripcionales independientes, ya que la mayoría de estos genes son cotranscritos.

algunas de estas unidades permanece casi constante. A pesar de ello, existen diferencias significativas en la abundancia de sus mRNAs (Deng y Gruissem, 1987; Deng y cols., 1987; Gruissem y Schuster, 1993; Mullet y Klein, 1987). Estos resultados han sugerido que la regulación postranscripcional, ya sea a nivel de procesamiento, estabilidad de los sRNA mensajeros o eficiencia de traducción, juega el papel más importante en el control de la expresión genética en los plástidos. La regulación postranscripcional también parece intervenir en la respuesta a señales ambientales, como por ejemplo, calidad de luz, herbicidas, y a señales de desarrollo, como es el caso del desarrollo de la raíz o la maduración del fruto (Deng y Gruissem, 1988; Gruissem y cols., 1988). Varios mecanismos que operan a nivel postranscipcional pudieran estar implicados en la regulación de la expresión de genes plastídicos. Algunos de ellos han sido analizados con más detalle y existen evidencias, en algunos casos, de su participación durante la regulación. Los más sobresalientes son:

- A pesar de que los genes cloroplásticos están organizados en unidades transcripcionales policistrónicas (figura 11-4), múltiples transcritos son detectados para cada una de estas unidades transcripcionales como resultado del procesamiento de los transcritos primarios. La separación física de cada uno de los genes que constituyen el trans-

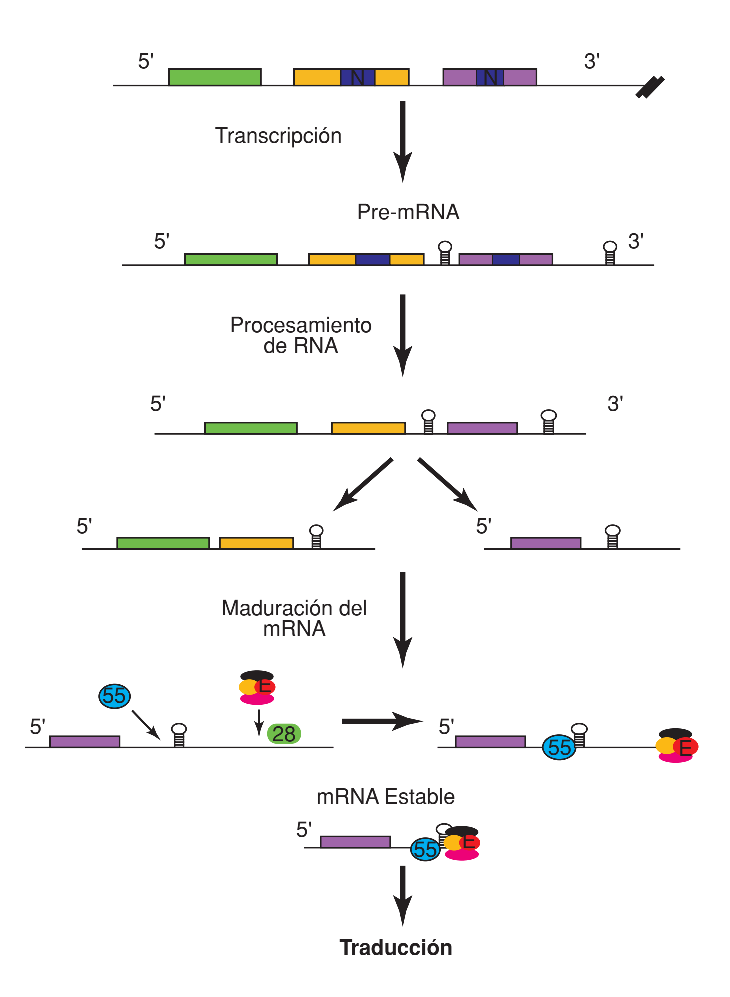


Figura 11-4. Regulación postranscripcional de los genes cloroplásticos. Las unidades transcripcionales del cloroplasto son policistrónicas y contienen en algunos casos intrones (IN). Estas unidades son transcritas como un precursor (pre-mRNA). Este precursor es procesado a su forma madura, a través de la remoción de los intrones, la separación de algunos genes y la remoción de la región 3' del mensajero. El procesamiento del 3' involucra a un complejo de alto peso molecular (CAPM) constituido por ribonucleoproteínas o RNP, entre ellas, encontramos a la RNP55 (azul), la RNP100 (negra), la RNP de 33 (amarilla), una endonucleasa (E) y una proteína denominada p67 (rosa). La participación de la RNP28 parece posicionar el sitio de entrada al CAPM, el cual degrada hacia el 5', hasta encontrar la estructura tallo y asa donde se forma un mensajero maduro. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

crito primario, los RNAs ribosomales, precursores de tRNA y todos los genes que contienen intrones, es un requerimiento, en muchos casos, para obtener moléculas de RNA funcionales. La maduración de estos RNA implican procesamiento, tanto en los extremos 3' como 5' no traducidos a través de cortes endonucleolíticos. A pesar de que, potencialmente, este mecanismo puede ser un nivel importante de regulación, no existe evidencia de que este tipo de procesamiento regule la expresión genética en cloroplastos.

- El procesamiento de intrones es un mecanismo de regulación postranscripcional. Muchas de las unidades transcripcionales cloroplásticas contienen intrones, en su mayoría de tipo II, a excepción de los rRNAs que contienen intrones del tipo I. Los intrones tipo I plastídicos pueden ser doblados con la estructura típica de los intrones tipo I descritos en los genes mitocondriales de hongos. Los intrones tipo II han sido descritos casi exclusivamente en organelos y presentan también una estructura secundaria característica que es requerida para su procesamiento (Michel y cols., 1991). En muchos casos, estos intrones contienen fases de lectura abierta que codifican para endonucleasas y madurasas de RNA (Saldanha y cols., 1993), actividades enzimáticas necesarias durante el procesamiento de los intrones. Aunque potencialmente el procesamiento de intrones pudiese ser un mecanismo de regulación de la expresión genética en los plástidos, hasta el momento no existen evidencias al respecto.

> Muchas de las unidades transcripcionales cloroplásticas contienen intrones.

- Otras dos características de los genes cloroplásticos son la presencia de empalmamiento en trans o *trans-splicing* (Rochaix, 1992), y la edición de RNA. En el transempalmamiento, la secuencia de un gen, como es el caso de la proteína ribosomal CS12 (*rps 12*), está dividida. Las regiones 5' y 3' de este gen son transcritas independientemente, y posteriormente las regiones 3' y 5' de los mensajeros respectivos son procesados y las moléculas resultantes unidas. El empalmamiento en trans es encontrado en otros genes cloroplásticos, como son *psaA* de *Chlamydomonas*. La edición de RNA involucra el cambio de bases específicas en el RNA mensajero, de las que están presentes en el DNA, y juega un papel esencial en producir moléculas de RNA funcionales (Gray y Covello, 1993).

  A pesar de que ambos mecanismos son esenciales para la expresión de los genes en los plástidos, aunque ninguno de ellos parece ser determinante en la regulación de la expresión genética del cloroplasto.

- Los datos más recientes apuntan a que uno de los factores postranscripcionales que juega un papel importante en la regulación de la expresión genética en plástidos es la estabilidad de sus mensajeros. A través de mediciones directas se ha observado que existe una marcada diferencia en la vida media de diferentes transcritos que depende tanto del estado de desarrollo como de las condiciones de crecimiento de la planta. Para entender las bases moleculares de la estabilidad diferencial de los RNA mensajeros plastídicos, se han disecado tanto las secuencias reguladoras en *cis* como proteínas que actúan en forma *trans* y que interaccionan con estas secuencias en los mensajeros de

varios genes cloroplásticos. Se ha encontrado que, en general, las regiones 3' no traducidas (3'UTR, del inglés *untranslated region*) de los mRNA del cloroplasto contienen secuencias repetidas invertidas (RI) que se estructuran en forma de tallo y asa (Stern y cols., 1989). Estas secuencias 3' RI son conservadas entre mRNAs específicos, aun entre plantas que divergen evolutivamente (Zurawski y Clegg, 1987). Las secuencias RI se parecen a las estructuras tallo y asa involucradas en la terminación de la transcripción de procariontes; sin embargo, se ha demostrado que, en los genes del cloroplasto, estas secuencias no funcionan como terminadores de la transcripción, sino, más bien, como elementos de procesamiento (Stern y Gruissem, 1987). Aún más, en estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado que las secuencias 3' RI provenientes de genes cloroplastos son capaces de estabilizar a otros mensajeros dentro del organelo (Stern y cols., 1991; Stern y cols., 1989).

La región 3' no traducida (3'UTR) de diferentes mRNAs cloroplásticos interacciona con varias proteínas. Algunas proteínas parecen unirse directamente a todas las secuencias RI, mientras que otras son específicas para los extremos 3'UTR de ciertos sRNA mensajeros (Gruissem y Schuster, 1993; Stern y cols., 1989). Con base en estos resultados, se piensa que las estructuras presentes en el 3' de los mensajeros cloroplásticos son requeridas para su procesamiento específico. Este procesamiento involucra un complejo multiproteico de alto peso molecular (Hayes y cols., 1996). Así, las proteínas que conforman dicho complejo se unen al mRNA y son responsables de regular la vida media de dicho mensajero a través de procesar correctamente sus extremos 3'. Algunas de las proteínas que forman parte del complejo de alto peso molecular han sido caracterizadas. Entre ellas, tenemos una proteína de 100 kDa identificada como una polinucleótido fosforilasa con actividad de exonucleasa 3' a 5' (PNPasa); una proteína de 67 kDa (p67), similar a la endorribonucleasa RNAsa tipo E de procariontes, y una proteína de 55 kDa que no presenta homología con proteínas aisladas anteriormente (p55) (Hayes y cols., 1996); todas ellas, al parecer, son requeridas independientemente del mensajero que se trate. En adición a las proteínas generales antes mencionadas, se han observado tres proteínas pequeñas (sRNP) que se unen a RNA de 33, 28 y 24 kD de tamaño, respectivamente. Se ha demostrado que estas sRNP son capaces de asociarse con el complejo de alto peso molecular y probablemente estén involucradas en la especificidad de reconocimiento para diferentes mensajeros (Hayes y cols., 1996).

En la actualidad, el modelo más aceptado del procesamiento de los mensajeros cloroplásticos es que los transcritos policistrónicos plastídicos son primeramente procesados, produciendo extremos 3' terminales específicos. Estos precursores pueden estar constituidos de sólo una unidad transcripcional o, en algunos casos, ser todavía mensajes policistrónicos (figura 11- 4). Estos precursores, en presencia de la proteína sRNP28, son endonucleolíticamente cortados hacia abajo del extremo 3' maduro por la acción del complejo PNPasa/RNAsa E. Después de este corte, existe una degradación exonucleolítica en dirección 3' a 5' que da como resultado la generación del

extremo 3' maduro estable (figura 11-4). Las proteínas 33RNP y la p55 parecen requerirse sólo para la estabilización del extremo 3' terminal maduro, ya que la proteína 33RNP previene la actividad continua de la PNPasa, mientras que la p55 previene la remoción endonucleolítica dependiente de la RNAsa E de la estructura de tallo y asa. Se sabe que en la ausencia de la proteína 28RNP, el complejo de las proteínas PNPasa/RNAsa E procesa incorrectamente los transcritos, lo que provoca que estos mRNA sean degradados, por lo que esta proteína parece estar involucrada en el reconocimiento específico de las secuencias de la región 3' de diferentes sRNA (Stern y Kindle, 1993). Hasta el momento, aún se desconoce si la 28RNP es en realidad una familia de proteínas muy similares pero con diferente especificidad; pero ya se ha aislado otra proteína, la 24RNP, que pareciera tener una función similar a la 28RNP.



Regulación de la expresión de genes nucleares que codifican para proteínas cloroplásticas

Alrededor de 90% de las proteínas cloroplásticas están codificadas en el núcleo y requieren ser importadas al cloroplasto para llevar a cabo su función. Entre algunas de éstas se encuentran las proteínas involucradas en la transcripción, traducción y replicación del organelo. En general, todas las proteínas nucleares cloroplásticas son transcritas por la polimerasa II. Los transcritos generados contienen intrones, y son protegidos en el extremo 5' con la adición de una guanosina modificada (CAP) y poliadenilados en su extremo 3'. Estos mRNA son transportados al citoplasma y traducidos en él, como cualquier otro mensajero nuclear. Este hecho implica la presencia de elementos en *cis* requeridos para su expresión y regulación nuclear. En el caso de que estos genes tengan un origen cloroplástico, los elementos regulatorios presentes en cada uno de ellos actualmente debieron ser adquiridos concomitantemente con su transferencia al núcleo. Los mecanismos a través de los cuales pudieron haberse obtenido dichas secuencias son totalmente desconocidos.

Alrededor de 90% de las proteínas cloroplásticas están codificadas en el núcleo.

Hasta el momento, los genes nucleares que codifican proteínas cloroplásticas que se han estudiado más exhaustivamente son aquellos relacionados con la fotosíntesis. En especial, dos familias genéticas han sido analizadas con mayor detalle tanto en su organización estructural como en su regulación; éstos son los genes que codifican para la subunidad pequeña de la enzima 1-5 bi-fosfato carboxilasa-oxigenasa o Rubisco (*rbcS*) y para la proteína unidora de clorofila a/b que forma parte del complejo antena LHII del fotosistema II (*cab*). Ambos están formadas por familias multigenéticas que se regulan de manera diferente y que codifican para proteínas idénticas o casi idénticas. Para el caso de *cab*, por ejemplo, en *Arabidopsis*, existen sólo tres genes localizados en forma contigua. En otro tipo de plantas, esta familia es mucho más grande. Tal es el caso de tabaco, con 19 miembros, los cuales han sido agrupados en subfamilias con base en la homología de su secuencia. Los genes de *rbcS* también forman una familia multigenética, cuyo número de miembros varía también entre las diferentes plantas. Tal

es el caso del tomate y la papa, que contienen 5 genes. Los miembros de los genes *cab*, en general, no presentan intrones, mientras que los genes para *rbcS* pueden presentar intrones, pero estos intrones no siempre están conservados entre los diferentes miembros.

El análisis de los genes cloroplásticos codificados en el núcleo ha mostrado que, en general, todos ellos contienen secuencias en la región 5' involucradas en el importe de la proteína al cloroplasto, conocidas como péptido de tránsito o péptido señal. Esta secuencia, en algunos casos, está separada del resto de la proteína por intrones. Este hecho hace pensar que, durante la evolución, estas secuencias se pudieron adquirir a partir de secuencias preexistentes en el genoma, a través de un intercambio o *shuffling*, el cual fue seleccionado para permitir el transporte de la proteína al organelo.

Los diferentes genes fotosintéticos nucleares son expresados preferencialmente en los tejidos verdes de las plantas.

En cuanto a su expresión, se sabe que, en general, los diferentes genes fotosintéticos nucleares son expresados preferencialmente en los tejidos verdes de las plantas y, en algunos casos, a muy bajos niveles en otros tejidos como la raíz. En el tejido fotosintético, su expresión no es homogénea sino que se restringe, al igual que para el caso de los genes codificados en el cloroplasto, a las células donde se realiza la fotosíntesis, conocidas como células del mesófilo y no a las células epidermales y vasculares de las hojas. Una excepción a esta generalización son las células estomales, las cuales, a pesar de tener un origen epidemal, contienen cloroplastos y expresan genes fotosintéticos. El análisis detallado de las regiones regulatorias de los genes de *cab* y de *rbcS*, en diferentes plantas superiores, han permitido la identificación de secuencias específicas que responden tanto a señales externas (luz, etc.) como al programa interno de desarrollo de la planta; por todo ello, se puede concluir que la regulación de la expresión de los genes fotosintéticos nucleares es altamente compleja.

Tal vez, una de las señales más importantes en el proceso de fotosíntesis es la luz. Ésta desempeña un papel fundamental en el desarrollo del cloroplasto y, concomitantemente, promueve la expresión de los genes fotosintéticos nucleares. Se han identificado secuencias específicas responsables de la regulación por luz y se sabe que muchos de los genes son regulados diferencialmente por diferentes longitudes de onda. Estas longitudes de onda son absorbidas por moléculas denominadas fotorreceptores. En la actualidad, se conocen tres clases de fotorreceptores en plantas y éstos regulan la expresión no sólo de genes fotosintéticos, sino también de otros genes (Furuya, 1993). A los elementos en *cis*, responsables de la regulación por luz, se les ha denominado LRE, elementos que responden a la luz. Se sabe que estos LRE son complejos y están formados por más de un elemento, donde interaccionan factores transcripcionales específicos. De esta manera, la combinatoria de estos elementos da la posibilidad de respuestas diferentes con un mismo estímulo (Argüello-Astorga y Herrera-Estrella, 1996).

Finalmente, en la región regulatoria de estos genes también se han encontrado secuencias que confieren expresión tejido específica, como aumentadores o silenciadores transcripcionales. Sin embargo, su función no está tan bien estudiada como para el caso de la luz, y poco se conoce aún,

tanto de las secuencias en *cis* como de los factores transcripcionales involucrados en este tipo de regulación.

En el caso de plantas que realizan fotosíntesis tipo C4, como es el maíz, caña de azúcar, etc., existe un nivel adicional de regulación, ya que la fotosíntesis se lleva a cabo en dos diferentes tipos celulares, las células de mesófilo y las del parénquima vascular (Furbank y Taylor, 1995). Cada una de dichas células lleva a cabo diferentes aspectos del proceso fotosintético, y este hecho se ve reflejado en la expresión de los genes fotosintéticos, así como en la estructura de los cloroplastos. Para el caso del maíz, que es tal vez la planta C4 mejor estudiada hasta la fecha, se sabe que los genes que codifican para enzimas involucradas en las fases luminosas de la fotosíntesis, así como los genes del ciclo de ácidos dicarboxílicos, entre ellos el gen *cab*, son expresados en las células del mesófilo. En contraste, todos aquellos genes que codifican para las enzimas necesarias para la fijación del nitrógeno por el ciclo de Calvin o de las pentosas fosfato reducidas, como es la *rbcS*, son expresados exclusivamente en las células del parénquima vascular. Microscópicamente, esto se ve reflejado en los cloroplastos a nivel estructural, ya que los cloroplastos de las células del mesófilo contienen un buen desarrollo tilacoideo, mientras que los de las células del parénquima vascular tienen pocos tilacoides.

En estas plantas, la fijación inicial del CO_2 se lleva a cabo por una vía específica conocida como el ciclo de los ácidos dicarboxílicos, en el cual el CO_2 es fijado por una molécula de 3 carbonos (fosfoenol piruvato) y convertido a una molécula de 4 carbonos, de donde deriva el nombre de fotosíntesis tipo C4, por la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa. Las enzimas involucradas en este proceso son particulares para plantas C4 y CAM. La expresión tejido específica requerida para estos genes depende de elementos regulatorios específicos que han sido adquiridos durante la evolución de estas plantas. Entre los elementos regulatorios estudiados, se han encontrado secuencias que responden a la luz, secuencias tejido específicas y secuencias que proveen altos niveles de expresión (Ku y cols., 1996). Estudios hechos en maíz con algunos genes fotosintéticos, como son la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEP carboxilasa) y la piruvato-ortofosfato dikinasa, a través de deleciones, han mostrado regiones específicas que se requieren para la expresión tejido específica en estos genes que se encuentran hacia arriba de la región promotora básica (región TATA) (Sheen, 1991). Hasta el momento, la mayoría de los elementos regulatorios analizados se encuentran localizados relativamente cerca de la iniciación de la transcripción de dichos genes, alrededor de 1 Kpb hacia arriba del inicio de la proteína. Son pocos los casos en los que se han localizado secuencias como aumentadores o silenciadores distantes del gen que regulan. Se ha comprobado que muchas de las secuencias que han sido definidas pueden conferir una regulación semejante a la del gen original cuando son puestas hacia arriba de otro gen (Nagy y cols., 1987).

A pesar de que la regulación transcripcional parece ser un factor muy importante en la expresión de los genes nucleares fotosintéticos, estudios recientes han mostrado que también componentes postranscripcionales tienen un papel importante en la regulación tejido específica de algunos genes. Tal es el caso del gen que codifica para la subunidad pequeña de Rubis-

co en maíz, cuyo mensajero es acumulado exclusivamente en las células del parénquima vascular y no en las del mesófilo. Estudios en células aisladas han mostrado que el gen de *rbcS* es transcrito tanto en las células del mesófilo como en las del parénquima vascular a niveles muy semejantes, lo que sugiere es que la acumulación diferencial en ambos tipos celulares se debe a eventos postranscripcionales.

Importe de proteínas al cloroplasto

A pesar de que el cloroplasto contiene un genoma propio, la mayoría de sus proteínas son codificadas en el núcleo.

Como se mencionó anteriormente, a pesar de que el cloroplasto contiene un genoma propio, la mayoría de sus proteínas son codificadas en el núcleo, traducidas en el citoplasma e importadas a los diferentes compartimentos cloroplásticos. Hasta ahora, todas las proteínas analizadas que se importan al cloroplasto son sintetizadas como un precursor de mayor peso molecular, el cual contiene en su amino-terminal una secuencia requerida para su importe al organelo y que se conoce como péptido de tránsito. Como se mencionó, los cloroplastos se subdividen por tres sistemas membranosos no contiguos, que da lugar a seis compartimentos suborganelares, en los cuales se realizan diferentes funciones metabólicas y relacionadas con la fotosíntesis (figura 11-3); cada uno de estos compartimentos requiere del importe de diferentes proteínas. Los péptido de tránsito, en los casos estudiados, contienen la información necesaria para el destino final de la proteína dentro del cloroplasto, y estas secuencias son removidas al final del transporte al organelo por un procesamiento específico. En muchos casos, este péptido está constituido únicamente por la información que se requiere para la entrada a través de la envoltura. Tal es el caso de las proteínas que se requieran en el estroma.

Sin importar el destino final de las proteínas en el cloroplasto, todas ellas deben inicialmente ser internalizadas a través de la envoltura cloroplástica que comprende las membranas externa e interna. Por el momento no se ha encontrado una secuencia consenso para el transporte por la envoltura entre los diferentes péptidos señal estudiados. Sin embargo, todos ellos contienen una serie de características distintivas como son: una riqueza relativa en serina y alanina, así como una baja cantidad de aminoácidos ácidos (Heijne y cols., 1989), lo que hacen que estos péptidos sean en general básicos (figura 11-5). Las reacciones de importe se inician, por lo tanto, con el reconocimiento del precursor proteico a la envoltura del cloroplasto por un complejo proteico de alto peso molecular presente en la membrana externa al cual se le ha denominado como TOC (del inglés *translocon at the outer membrane chloroplast*). Durante este reconocimiento, el precursor se asocia con la membrana externa del cloroplasto a través del péptido señal. Esta interacción tiene una alta afinidad y es esencialmente irreversible y se conoce como intermediario temprano (figura 11-6). Este proceso involucra una unión específica con una proteína receptora y el precursor proteico. Se ha identificado que existen puntos específicos de unión para el importe en la membrana del cloro-

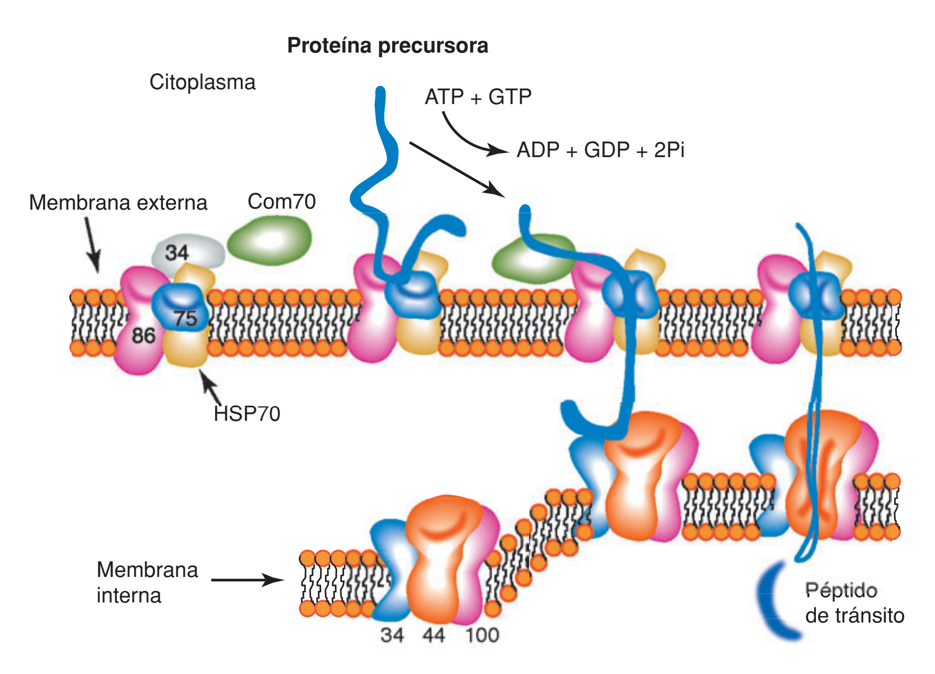


Figura 11-5. Modelo del importe de proteínas a través de la cubierta (membranas externa e interna) del cloroplasto. Las proteínas citosólicas son producidas como un péptido precursor que se une a un complejo proteico de la membrana externa. Esta unión depende de ATP. El complejo proteico esta formado por varias proteínas de diferente peso molecular. Después de la unión, el péptido es transportado a través de las dos membranas, posiblemente, a través de un poro formado por proteínas de ambas membranas. Durante el paso del péptido, la señal de tránsito al cloroplasto es removida por una proteasa específica que se encuentra en el estroma. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

plasto (cerca de 2,000 o 3,000 por organelo). Una vez que la interacción inicial se ha llevado a cabo, el intermediario inicial es transportado al estroma del organelo. Este transporte se lleva a cabo cruzando simultáneamente la membrana externa y la membrana interna, en sitios en los cuales ambas membranas están en íntimo contacto. Este paso requiere de ATP y al final del mismo el péptido de tránsito de la envoltura es removido a través de proteasas específicas estromales. Existen evidencias experimentales en cuanto a la naturaleza del aparato de importe en especial de la membrana externa TOC; se sabe que éste está constituido por un complejo de por lo menos 7 proteínas de membrana externa que incluyen a dos proteínas que unen GTP (34 y 86 kD), un canal (75 kD) y por lo menos dos diferentes chaperonas (HSP70 y Com70) (Keegstra y Cline, 2000). Del complejo de importe de la membrana interna se conoce menos y, hasta el momento, se han logrado identificar seis componentes los cuales también incluyen a chaperonas estromales del tipo ClpC y Cpn60 (figura 11-5). Hasta ahora, los estudios realizados apoyan la existencia de un mecanismo común para el transporte de todos los precursores cloroplásticos al estroma. Un dato interesante es que los componentes del transporte de la envoltura externa del cloroplasto que se han caracterizado, no presentan semejanzas con el transporte mitocondrial, a pesar de que ambos organelos requieren de la introducción de proteínas

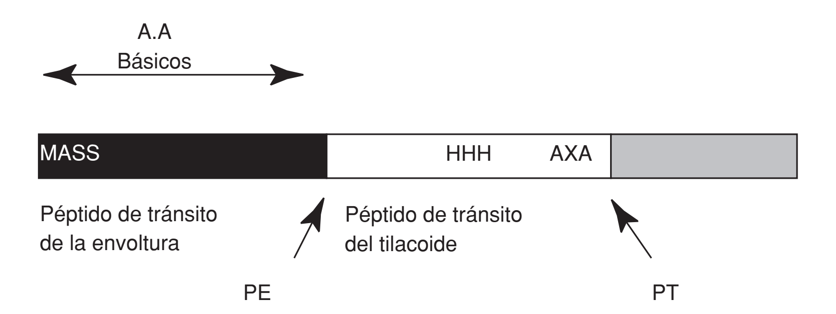


Figura 11-6. Estructura de la secuencia de importe de proteínas nucleares que van al lumen del tilacoide. Esta estructura comprende dos señales específicas, una seguida de otra: un péptido de tránsito para la envoltura que se caracteriza por la presencia de aminoácidos básicos como serina y treonina. Esta señal es removida por una peptidasa específica en el estroma (PE). La señal de transferencia al tilacoide contiene regiones hidrofóbicas (H) y residuos chicos, como alanina (A), cerca del sitio de corte (AXA). Esta señal es removida por una peptidasa tilacoidal (PT).

por dos sistemas membranales, y que se sabe que el proceso de importe es semejante. Esto sugiere que ambas maquinarias han evolucionado independientemente (Schell, 1995).

Una gran cantidad de proteínas deben de relocalizarse en otros espacios del plástido como son la membrana del tilacoide, el lumen del tilacoide, etc. (figura 11-3). Hasta el momento, el transporte más estudiado es el de proteínas que van hacia el lumen del tilacoide, como por ejemplo, la plastocianina y los componentes del complejo captador de oxígeno. Este transporte requiere dos pasos de importe, inicialmente los péptidos deben ser transportados al estroma y posteriormente el intermediario proteico debe de ser internalizado en la membrana del tilacoide, donde sufre un segundo procesamiento por una peptidasa específica del tilacoide. Este hecho supone, para este tipo de proteínas, la existencia de dos señales consecutivas. La primera es el péptido señal de envoltura de la membrana externa con las características que se describieron en el párrafo anterior, y la segunda, es un péptido de transferencia tilacoidea. La estructura de este tipo de péptidos se esquematiza en la figura 11-6. Existe una clara homología entre la maquinaria proteica de importe para las membranas tilacoideas y la usada o las usadas por células procariónticas durante la secreción de proteínas (Smeekens *y cols.,* 1990). Análogamente, los péptidos para dicho importe también guardan semejanza con los péptidos de tránsito de procariontes, con dominios hidrofóbicos y residuos de cadenas cortas, como alanina. Recientemente, la caracterización de mutantes en importe de proteínas que van al lumen del tilacoide ha permitido postular la existencia de por lo menos cuatro mecanismos de importe (Voelker y Barkan, 1995). Uno de ellos tiene homología con el sistema de secreción de *Escherichia coli*, mediado por los genes *Sec AY*, y debido a esto se le ha denominado la vía *Sec*. Otro depende del gradiente de pH del tilacoide, y es probable que no requiera de un aparato de transporte específico, sino de una interacción directa del precursor con la membrana tilacoidea a través de fuerzas electrostáticas. Otro guarda homología con los sistemas de reconocimiento de partícula (SRP) para el retículo en-

doplásmico, el cual es dependiente de GTP (Keegstra y Cline, 2000). Estos resultados sugieren que el sistema de importe tilacoidal parece haber evolucionado a partir del sistema de exporte procariónticο, genes homólogos a *SecA* y *SecY* han sido aislados en diferentes plantas como *Arabidopsis*, lo que apoya esta idea (Osteryoung, 1996; Laidler y cols., 1995). Se sabe que diferentes proteínas utilizan cada uno de estos sistemas; por ejemplo, la plastocianina, el citocromo f y la subunidad F del Fotosistema 1 son transportados a través de los genes homólogos a *SecA/SecY*. Actualmente, los mecanismos moleculares del transporte para cada una de estas vías están aún por detallarse, y el análisis de mutantes afectadas en este proceso será sumamente útil para dicho análisis.



Resumen

En este capítulo se ha tratado de cubrir los aspectos más sobresalientes de la biología de los plástidos. Los estudios que se han realizado hasta el momento en cuanto a la funcionalidad de cloroplasto y de otros tipos de plástidos han puesto de manifiesto la complejidad de la regulación y el mantenimiento de estos organelos. Está claro que una gran cantidad de genes tanto nucleares como cloroplásticos actúan de forma coordinada para realizar sus funciones. Los efectos pleitrópicos observados ponen de manifiesto la continua dependencia del núcleo para su desarrollo y función, y la continua retroalimentación que guardan estos organelos con su medio ambiente. Existe aún una gran cantidad de preguntas por resolverse en cuanto a la participación de genes nucleares en la regulación del desarrollo de estos organelos. La obtención y caracterización de mutantes afectadas en este tipo de aspectos será crucial para un mejor entendimiento y disección de los diferentes episodios moleculares que conllevan al desarrollo de estos organelos. Es importante tener en cuenta el hecho de que, en adición a la fotosíntesis, los plástidos desempeñan funciones indispensables para las células vegetales, como son la síntesis de algunas hormonas, lípidos, etc., y que el progreso del conocimiento en esta área guarda un papel central en la biología vegetal.



Referencias bibliográficas

Argüello-Astorga, G.R. y Herrera-Estrella, L.R., "Ancestral multipartite units in light-responsive plant promoters have structural features correlating with specific phototransduction pathways", *Plant Physiol.,* **112:** 1151-1156, 1996.

Clowes, F.A.L. y Juniper, B.E., *Plant Cells,* Oxford/Edimburgo, Blackwell, 546, 1968.

Deng, X.W. D.B.; S.; J.C., T. y Gruissem, W., "Plastid run-on transcription. Aplication to determine the transcriptional regulation of spinach plastid genes", *J. Biol. Chem.,* **262:** 9641-9648, 1987.

——— y Gruissem, W., "Control of plastid gene expression during development: The limited role of transcriptional regulation", *Cell,* **49:** 379-387, 1987.

——— y Gruissem, W., "Constitutive transcription and regulation of gene expression in non-photosynthetic plastids of higher plants", *EMBO J.,* **7:** 3301-3308, 1988.

Feldmann, L.J., "Root gravitropism", *Physiol. Plant,* **65:** 341-344, 1985.

Furbank, R. y Taylor, W., "Regulation of Photosynthesis in C3 and C4 plants: a molecular approach", *Plant Cell,* **7:** 797-807, 1995.

Furuya, M., "Phytochromes: their molecular species, gene families and functions", *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.,* **44:** 617-645, 1993.

Gray, M.V. y Doolittle, W.F., "Has the endosymbiont hypothesis been proven?", *Microbiol. Rev.,* **46:** 1-42, 1982.

Gray, M.W. y Covello P.S., "RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts", *FASEB J.,* **7:** 64-71, 1993.

Green, P.B., "Cinematic observations on the growth and division of chloroplasts in *Nitella", Am. J. Bot.,* **51:** 334-342, 1964.

Gruissem, W.; Barkan, A.; Deng, X.W. y Stern, D., "Transcriptional and post-transcriptional control of plastid mRNA levels in higher plants", *TIG,* **4:** 258-263, 1988.

——— y Schuster, G., "Control of mRNA degradation in organelles", en *Control of messenger RNA stability,* Belasco, J. y Brawerman, G., eds., Nueva York, 329-365, 1993.

Hayes, R.; Kudla, J.; Schuster, G.; Gabay, L.; Maliga, P. y Gruissem, W., "Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins", *EMBO J.,* **15:** 1132-1141, 1996.

Heijne, G.; Steppuhn, J. y Herrmann, R.G., "Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides", *Eur. J. Biochem.,* **180:** 535-545, 1989.

Keegstra, K. y Cline, K., "Protein import and routing systems of chloroplasts", *Plant Cell,* **11:** 557-570, 2000.

Kirk, J.T.O. y Tilney-Bassett, R.A.E., "The Plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance", en Elsevier, eds., Holanda del Norte, 960, 1978.

Ku, M.S.B.; Kano-Murakami, K. y Matsuoka, M., "Evolution and expression of C4 photosynthetic genes", *Plant Physiol.,* **111:** 949-957, 1996.

Laidler, V.; Chaddock, A.M.; Knott, T.G.; Walker, D. y Robinson, C., "A SecY homolog in *Arabidopsis thaliana*: sequence of a full-length cDNA clone and import of the precursor protein into chloroplast", *J. Biol. Chem.,* **270:** 17664-17667, 1995.

Langlade, J.A.; Rothermel, B.A. y Nelson, T., "Cellular patterns of photosynthetic gene expression in developing maize leaves", *Genes Dev.,* **2:** 106-115, 1988.

Lawlor, D.W., "Photosynthesis: Molecular, physiological and enviromental processes", en Longman Scientific and Technical, Longman Group, eds., Essex, Inglaterra, 52-72, 1993.

León, P.; Arroyo, A. y Mackenzie, S., "Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants", *Ann. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Biol.,* **49:** 453-480, 1998.

Mayfield, S.P.; Yohn, C.B.; Cohen, A. y Danon, A., "Regulation of chloroplast gene expression", *Ann. Rev. Plant Physiol.,* **46:** 147-166, 1995.

Michel, F.; Umesono, K. y Ozeki, H., "Comparative and functional anatomy of the group II catalytic introns- a review", *Gene,* **82:** 5-30, 1991.

Mullet, J., "Molecular biology of photosynthesis in higher plants", en *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology,* Longman Scientific and Technical, Dennis, D.a.T., D., eds., 198-211, Essex, Inglaterra, 1990.

Mullet, J.E. y Klein, R.R., "Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels", *EMBO J.,* **6:** 1571-1579, 1987.

Nagy, F.; Boutry, M.; Hsu, M.Y.; Wong, M. y Chua, N.H., “The proximal region of the wheat cab gene contains a 268-bp enhancer-like sequence for phytochrome response”, *EMBO J.,* **6:** 2537-2542, 1987.

Osteryoung, K.W., “*Arabidopsis* Homologs of bacterial cell division protein FTSZ are likely components of the plastid division machinery”, *Plant Physiol.*, supl., **111;** 43, 1996.

Palmer, J.D., “Comparative organization of chloroplast genomes”, *Ann. Rev. Genet.,* **19:** 325-354, 1885.

Rochaix, J.D., “Post-transcriptional steps in the expression of chloroplast genes”, *Ann. Rev. Cell Biol.,* **8:** 1-28, 1992.

Saldanha, R.; Mohr, G.; Belfort, M. y Lambowitz, A.M., “Group I and group II introns”, *FASEB J.,* **7:** 15-24, 1993.

Schell, D., “Shedding light on the chloroplast protein import machinery”, *Cell,* **83:** 521-524, 1995.

Schimper, A.F.W., “Untersuchungen uber die Chlorophyllkorper und dieihnen homologen Gebilde”, *Jahrb. Wiss. Bot.,* **16:** 1-247, 1885.

Sheen, J., “Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize pyruvate, orthophosphate dikinase genes”, *Plant Cell,* **3:** 225-245, 1991.

Smeekens, S.; Weisbeek, P. y Robinson, C., “Protein transport into and within chloroplasts”, *TIBS,* **15:** 73-76, 1990.

Stern, D.B.; E.R.; R. y Kindle, K.L., “A 3' stem/loop structure of the Chlamydomonas chloroplast *atpB* gene regulates mRNA accumulation *in vivo*”, *Plant Cell,* **3:** 285-297, 1991.

———— ; Jones, H. y Gruissem, W., “Function of plastid mRNA 3' inverted repeats: RNA stabilization and gene-specific protein binding”, *J. Biol. Chem.,* **264:** 18742-18750, 1989.

———— y Gruissem, W., “Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilizing elements, but do not terminate transcription”, *Cell,* **51:** 1145-1157, 1987.

———— y Kindle, K., “3' End maturation of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast *atpB* mRNA is a two step process”, *Mol. Cell Biol.,* **13:** 2277-2285, 1993.

Susek, R. y Chory, J., “A tale of two genomes: role of a chloroplast signal in coordinating nuclear and plastid genome expression”, *Aust. J. Plant Physiol.*, **19:** 387-399, 1992.

Thomson, W.W. y Whatley, J.M., “Development of nongreen plastids”, *Ann. Rev. Plant Physiol.,* **31:** 375-394, 1980.

Voelker, R. y Barkan, A., “Two nuclear mutations disrrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylacoid”, *EMBO J.,* **14:** 3905-3914, 1995.

Wei, N. y Deng X.W., “The role of the *COP/DET/FUS* genes in light control of Arabidopsis seedling development”, *Plant Physiol*., **112:** 871-878, 1996.

Whatley, J.M., “A suggested cycle of plastid developmental interrelationships”, *New Phytol.,* **80:** 489-502, 1978.

Woodrow, I.E. y Berry, J.A., “Enzymatic regulation of photosynthetic CO_2 fixation in C3 plants”, *Ann. Rev. Plant Physiol.,* **39:** 533-594, 1988.

CAPÍTULO 12

EL NÚCLEO INTERFÁSICO. MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN

Gerardo Hebert Vázquez Nin
Olga Margarita Echeverría Martínez
Luis Felipe Jiménez-García



Introducción

El núcleo es un compartimento celular limitado por una cisterna interrumpida por poros, que contiene el material genético constituido por el ácido desoxirribonucleico (DNA), y los componentes necesarios para la transcripción de la información genética en ácido ribonucleico (RNA), para el procesamiento del RNA y, eventualmente, para la duplicación del DNA.

La observación del núcleo con el microscopio óptico muestra la existencia de diversas estructuras: un límite del compartimento —la envoltura nuclear—, el nucleolo, grumos de cromatina y un espacio no ocupado por el nucleolo ni por la cromatina compactada en cuerpos visibles. Este espacio se suele llamar región intercromatiniana y se emplea el nombre de región pericromatiniana, en forma arbitraria, a una franja de 10 a 150 nanómetros (se abrevia "nm" y corresponde a 10^{-9} metros, que equivale a la milimicra) de ancho que rodea a los cúmulos de cromatina compacta. El microscopio electrónico permitió visualizar además varias estructuras ribonucleoproteicas mucho más pequeñas que el nucleolo, cuyo tamaño las sitúa por debajo de la resolución del microscopio óptico. El empleo de técnicas complementarias a la microscopia electrónica, como son la citoquímica clásica, la inmunocitoquímica, la hibridación *in situ*, la autorradiografía de alta resolución cuantitativa, los crio-métodos de preparación y análisis del material biológico y la espectrometría de pérdida de energía de electrones, han aportado numerosos conocimientos sobre la función y composición de las estructuras nucleares. Las escasas investigaciones conjuntas entre bioquímicos y morfólogos han resultado en avances definitivos del conocimiento, porque aclaran aspectos más amplios de un mismo fenómeno, integrando los resultados obtenidos con métodos diferentes.

El compartimento nuclear no existe en todas las células, aunque sus funciones son aseguradas por componentes presentes en el compartimento general protoplasmático. La ausencia o presencia de núcleo —entendido como compartimento— es la característica principal que se toma en cuen-

> La ausencia o presencia de núcleo es la característica principal que se toma en cuenta para definir grandes grupos de seres vivos, los procariontes y los eucariontes, respectivamente.

ta para definir grandes grupos de seres vivos, los procariontes y los eucariontes, respectivamente.



Aspectos evolutivos

Los procariontes aparecieron antes que los eucariontes y, en alguna forma aún desconocida, estos últimos se originaron a partir de aquéllos.

Es muy difícil determinar cuándo aparecieron los primeros seres con núcleo. El empleo de dos métodos de estudio ha proporcionado datos que han aportado precisiones sobre la cronología del origen del núcleo. Estos métodos son: el estudio del registro fósil y la investigación de la divergencia de secuencias genéticas.

El primero de los procedimientos presenta el problema de que en los fósiles rara vez se conservan los detalles internos de las células. Las claves más seguras para suponer que un fósil corresponde a un eucarionte son, el tamaño celular y la multicelularidad. Las células eucariontes actuales son un orden de magnitud más grandes que los procariontes vivientes, medidas en una sola dimensión. La diferencia en volumen es cercana a tres órdenes de magnitud. Restos carbonosos en forma de cinta espiral de 5 a 15 cm de largo y 2 mm de ancho de 2,100 millones de años fueron encontrados en Michigan, Estados Unidos (Weiguo, 1994). Las estructuras celulares no están preservadas por lo que hay dudas acerca de si provienen de colonias de procariontes o de eucariontes multicelulares. La existencia de eucariontes multicelulares hace más de 1,000 millones de años (1,200 millones de años aproximadamente) está documentada por fósiles de algas filamentosas similares a las algas rojas actuales del género *Bangia*, con una estructura multicelular bien conservada (Weiguo, 1994). También se han encontrado fósiles macroscópicos vermiformes en rocas de 850 hasta 740 millones de años de antigüedad. En el intervalo de 590 a 540 millones de años antes del presente, se encuentran fósiles e improntas de seres de cuerpo blando de aspecto moruliforme y otras similares a Cnidarios que se llaman metazoarios tipo Ediacara, por el nombre del lugar de Australia donde se encontraron. Estos seres desaparecen al comenzar el periodo Cámbrico (Weiguo, 1994). Desde su comienzo, hace unos 600 millones de años, este periodo se caracteriza por la rápida aparición de fósiles de animales pequeños provistos de esqueleto y por el aumento del número, variedad y complejidad de los fósiles. Se registran especies que se han clasificado en la mayoría de los *Phyla* actuales y otras que probablemente correspondan a grupos que no han sobrevivido más allá del Cámbrico. Los registros fósiles de protistas, es decir, eucariontes unicelulares, son muy escasos y aparecen junto con los metazoarios tipo Ediacara.

El estudio de las divergencias de secuencias genéticas selectas —ATPasa, citocromo c, citocromo c oxidasa, hemoglobina, NADH deshidrogenasa, rRNA 18S— muestra que los principales *Phyla* de metazoarios divergieron mucho antes del comienzo del periodo Cámbrico (Wray y cols., 1996). Por ejemplo, la divergencia de protostomados (Cordados) y deuterostomados (Anélidos, Artrópodos, Moluscos) sucedió, según los datos aportados por es-

te método, hace alrededor de 1,200 millones de años. Lo que indica que ya había eucariontes metazoarios 600 millones de años antes del comienzo del Cámbrico. La separación entre Equinodermos (deuterostomados) y Cordados es más reciente. Éstos y otros resultados obtenidos por el análisis de divergencia de secuencias genéticas, confirman las nociones generalmente aceptadas en taxonomía evolutiva (Wray y cols., 1996). Como estos estudios no involucran a los protistas, es plausible que la aparición de estos eucariontes unicelulares sea netamente más antigua que los 1,200 millones de años estimados para la divergencia entre grupos de metazoarios (figura 12-1).

En cuanto a la forma en que se originó el núcleo existen dos teorías, una propone que se formó a partir de la invaginación de la membrana celular de procariontes ancestrales y la otra que se originó de una simbiosis entre dos procariontes muy diferentes.

La primera teoría se basa en la observación de que, en bacterias actuales, el DNA se une a una zona especial de la membrana celular llamada mesosoma y que existen otras regiones especializadas de dicha membrana celular. El mesosoma pudo haberse invaginado en forma de copa, constituyendo así una cisterna que rodeara una porción del citosol con el DNA y lo separara del resto del citosol sin DNA. El lumen o luz de la cisterna sería equivalente al espacio extracelular. El retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los lisosomas y las vesículas de secreción pudieron haberse formado del pedículo de la invaginación nuclear o bien de otras

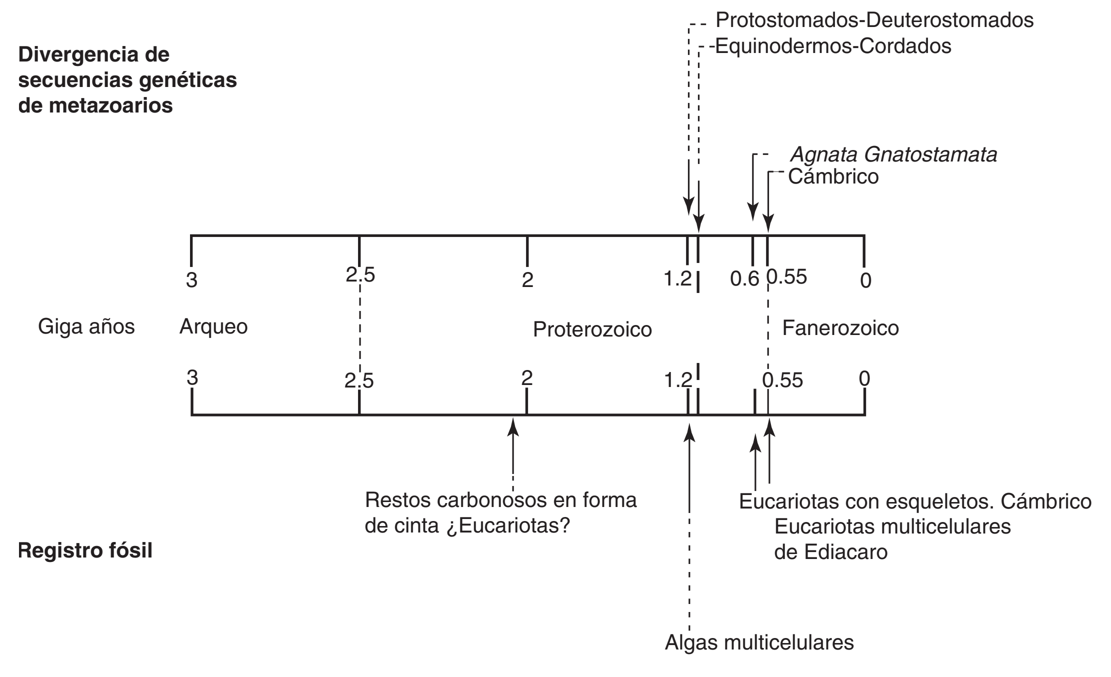


Figura 12-1. Cronología de algunos hechos relacionados con el origen y evolución de los eucariontes de acuerdo con datos obtenidos por dos métodos diferentes: divergencia de secuencias genéticas, según Wray y cols. (1996), y hallazgos de fósiles, según Weigo (1994).

invaginaciones de regiones especializadas de la membrana celular. Es importante notar que todos los eucariontes actuales tienen, además de núcleo, organelos como el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, lo que sugiere la posibilidad de que estas estructuras hayan tenido un origen común.

La segunda teoría sobre la formación del núcleo de los eucariontes propone un origen endosimbiótico, de manera que el antecesor del citoplasma sería diferente al antecesor del núcleo (Gray, 1992; Sogin, 1994). El antecesor del núcleo sería un procarionte con genoma compuesto por DNA, probablemente ya organizado en un solo cromosoma y poseedor de un avanzado aparato de traducción. El antecesor del citoplasma poseería un citoesqueleto que le daría la posibilidad de fagocitar a otros microorganismos, su genoma estaría aún formado por RNA únicamente y tendría una capacidad muy desarrollada de procesar el RNA (Gray, 1992). La fusión de estos organismos habría creado una quimera con características que entre los seres actuales sólo poseen los eucariontes, como el citoesqueleto y un procesamiento de los RNAs muy complejo, junto con rasgos propios de eubacteria y grandes similitudes con arqueobacteria. Por ejemplo, los dos polipéptidos de mayor peso molecular de las RNA polimerasas I, II y III de eucariontes son homólogos a la única RNA polimerasa de eubacterias (Gray, 1992). Las similitudes entre arqueobacterias y eucariontes son múltiples: algunos de esos procariontes contienen proteínas que se unen al DNA semejantes a las histonas, poseen RNA 5S y el RNA de transferencia que provee el primer ácido aminado durante la síntesis de proteínas corresponde a metionina. Estas características son similares a las de eucariontes y difieren de las de eubacterias y, sobre todo, la secuencia del factor de elongación EF-1α ha sugerido que las arqueobacterias termófilas que metabolizan azufre son los parientes vivos más próximos de los eucariontes (Gray, 1992).

Las arqueobacterias son los parientes vivos más próximos de los eucariontes.

Los tipos de estructuras que contienen RNA y DNA existentes en los núcleos de los eucariontes y su distribución espacial demuestran importantes similitudes entre plantas, animales y hongos y una mayor diversidad entre los protistas (Jiménez-García y cols., 1989). Sin embargo, todos los grupos de eucariontes estudiados tienen una cisterna que rodea al núcleo —envoltura nuclear— y configura el límite del compartimento. También es constante la presencia del nucleolo, de la cromatina y de partículas ribonucleoproteicas más pequeñas que el nucleolo que contiene diferentes tipos de RNA. Las proporciones de cromatina compacta y extendida pueden variar mucho, en algunos protistas —*Entamoeba* y *Giardia*— puede faltar durante gran parte de la interfase la cromatina condensada, mientras en otros la mayor parte de la cromatina está condensada, como en el micronúcleo de los ciliados, en donde este tipo de cromatina conforma un retículo que ocupa casi todo el espacio nuclear. Otros ejemplos de distribuciones particulares de la cromatina son, las euglenas, los dinoflagelados y el macronúcleo de los ciliados que presentan cromosomas interfásicos (Jiménez-García y cols., 1989). Los protistas tienen partículas ribonucleoproteicas (RNP) no nucleolares, muy diferentes tanto entre unos y otros, como entre cualquiera de ellos y el grupo formado por plantas, animales y hongos, en los que esas partículas están muy conser-

vadas. En euglenas (Moyne y cols., 1975), ciliados y amebas hay partículas RNP que no se encuentran en otros grupos y por otra parte, no existen en ellos algunas de las partículas comunes en los eucariontes superiores (Jiménez-García y cols., 1989), mientras que *Volvox* y algunos flagelados poseen los mismos tipos de estructuras RNP que se ven en metafitas, metazoos y hongos (Jiménez-García y cols., 1989). La variabilidad de las estructuras RNP relacionadas con la transcripción y el procesamiento de los RNA mensajeros en el grupo de los protistas y su constancia en los otros grupos de eucariontes, hace pensar que el conjunto de reacciones que configuran el procesamiento postranscripcional de los RNA mensajeros evolucionó en varias líneas diferentes, antes de la aparición de los tres grupos de eucariontes multicelulares. Algunos entre ellos tienen un antecesor común con el grupo de las plantas, animales y hongos más reciente que los otros, y esto se evidencia en la similitud de sus partículas RNP no nucleolares, así como en la distribución de la cromatina y la arquitectura general del núcleo.

Un caso único entre los eucariontes lo forma el *Phylum Dinoflagellata* porque carece de histonas. Las histonas son proteínas básicas de bajo peso molecular que se unen en forma de octámeros al DNA. Éste da casi dos vueltas alrededor del octámero de histonas, conformando una estructura —el nucleosoma— que se repite a lo largo de la doble cadena de DNA, aumentando su resistencia a los ataques físicos y químicos. Las histonas y los nucleosomas existen en todos los demás eucariontes estudiados, lo que hizo suponer que los dinoflagelados son un grupo muy antiguo entre los eucariontes, probablemente separado de la línea evolutiva de los demás miembros del grupo, antes de la aparición de las histonas. Sin embargo, la comparación de las secuencias de bases del RNA contenido en la partícula menor del ribosoma de los dinoflagelados con el de otros grupos de eucariontes demostró que ese *Phylum* se separó de la línea evolutiva principal que originó los metazoarios junto con Amplicomplexanos y los ciliados, formando parte del grupo de los Alveolados (Sogin, 1994). Por otra parte, los dinoflagelados tienen un citoplasma con organelos como retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias, cloroplastos, un núcleo similar a los demás eucariontes, con una envoltura nuclear cisternal con poros, nucleolo, partículas ribonucleoproteicas no nucleolares similares a las de hongos, metazoarios y metafitas (Echeverría y cols., 1993) e incluso nucleoesqueleto (Echeverría y cols., 1993; Mínguez y cols., 1994). Estos datos llevan a considerar que lo más probable es que los antecesores del grupo hayan perdido los genes de histonas, lo que resulta sumamente sorprendente, pues las mutaciones, aun las puntuales de alguno de dichos genes, son letales en plantas y animales actuales.



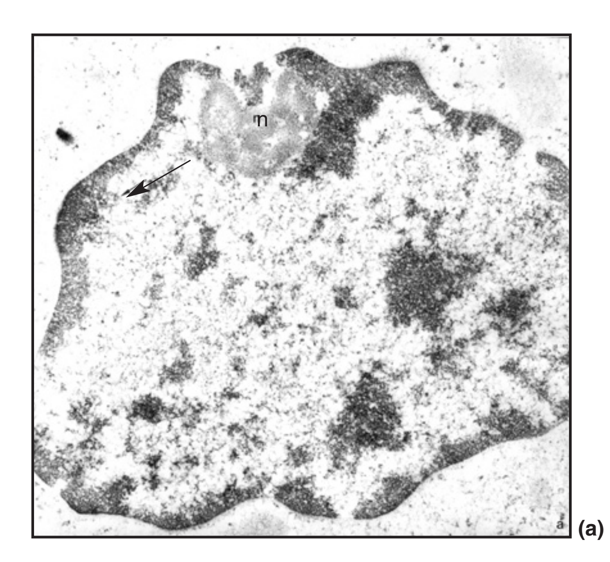
Cromatina

Características generales

La cromatina es un componente nuclear fácilmente observable en las preparaciones comunes de microscopia óptica y electrónica. Esto se debe

a su gran concentración espacial. Por ejemplo, el ser humano tiene 46 cromosomas con alrededor de 6×10^9 pares de nucleótidos. Si éstos estuvieran extendidos y alineados tendrían aproximadamente un metro con 80 centímetros de longitud. Esta cantidad de DNA está acomodada en núcleos, de los cuales muchos tienen 0.01 milímetros (10 micras, μm) de diámetro. Lo que representa una compactación de entre 5,000 y 10,000 veces.

Los cromosomas no son generalmente distinguibles en interfase. En este periodo de activa transcripción y duplicación del DNA, se pueden visualizar cúmulos de cromatina de diferente tamaño y disposición, dependiendo del estado de compactación del material cromosómico en los diferentes eucariontes y dentro de cada uno de ellos dicha compactación varía en las diferentes estirpes celulares y estados citofisiológicos (figura 12-2). De esto se deduce que no toda la cromatina de cada núcleo existe en el mismo estado de compactación. En efecto, la cromatina que se ve con facilidad en forma de granos o de cúmulos es la cromatina compacta o heterocromatina, mientras que el resto del material cromosómico



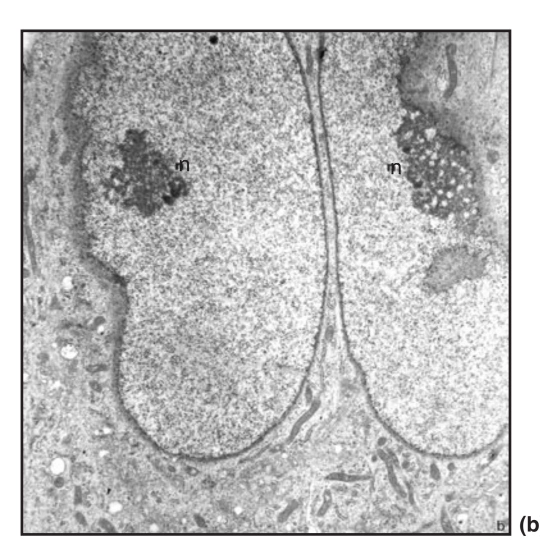


Figura 12-2. Micrografías electrónicas mostrando la cromatina del núcleo de un hepatocito (a) y en células en cultivo en crecimiento exponencial (b).
a) El hepatocito está contrastado con el método del ácido fosfotúngstico acuoso (PTA), que muestra preferencialmente la cromatina (Vázquez Nin y cols., 1973), por lo que las partículas ribonucleoproteicas no se distinguen, salvo el nucleolo (n) que se ve gris claro y no demuestra su estructura interna. En el citoplasma tampoco se ven estructuras. La cromatina compacta aparece adosada a la envoltura nuclear y rodea parcialmente al nucleolo. La cromatina laxa está formada por delgados hilos que parten del borde de la cromatina compacta y se extienden por el espacio intercromatiniano o nucleoplasma (flecha).
b) Célula epitelial endometrial binucleada en cultivo. El contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo muestra todas las estructuras sin ser preferencial para alguna. En los núcleos se advierte la envoltura nuclear, el nucleolo (n) y todo el resto del espacio nuclear ocupado por una mezcla de estructuras granulares y filamentosas constituidas por partículas ribonucleoproteicas y por cromatina laxa, cuyos componentes no se individualizan.

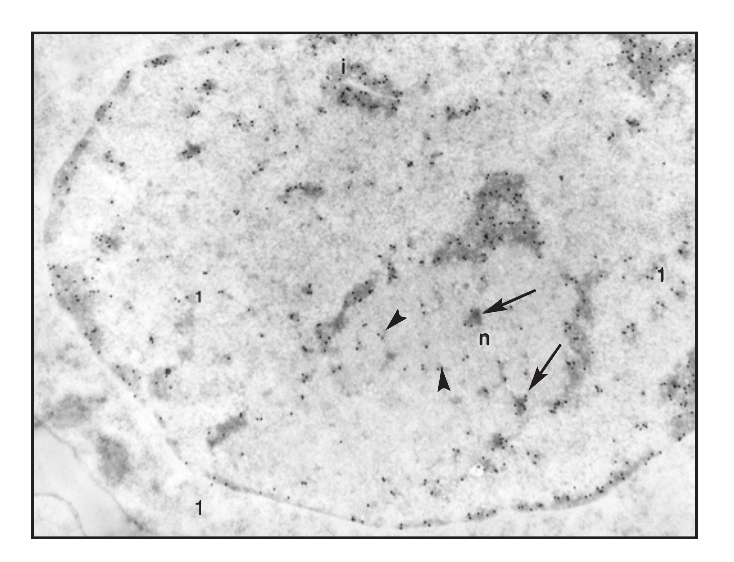


Figura 12-3. Micrografía electrónica contrastada con el método del PTA de una célula de cultivo en la que se ha inmunolocalizado el DNA empleando granos de oro como marcador. Las zonas grises oscuras corresponden a la cromatina compacta y están a la vez contrastadas y marcadas. El nucleolo (n) está parcialmente rodeado por cromatina compacta y contiene en su interior algunos pequeños cúmulos de cromatina compacta (flechas) y cromatina laxa marcada con oro (cabezas de flecha). Algunos filamentos de cromatina laxa situados en el nucleoplasma están también marcados con oro (1). Delgadas invaginaciones de la envoltura nuclear están rodeadas por cromatina compacta (i).

está en forma extendida constituyendo la eucromatina. La eucromatina no se ve con el microscopio óptico, pues los delgados filamentos que la forman están por debajo de la resolución de éste. Con el microscopio electrónico pueden ponerse de manifiesto los filamentos de cromatina laxa o extendida mediante técnicas de contraste especiales (figuras 12-2a y 12-3), que se unen únicamente a los componentes de la cromatina (Cogliati y Gautier, 1973; Vázquez Nin y cols., 1973 y 1995). Diversos experimentos, entre los cuales se encuentran los realizados mediante autorradiografía ultraestructural después de marcado con uridina tritiada (Fakan y Bernhard, 1971 y 1973), han demostrado que la síntesis de RNA, es decir, la transcripción de los genes en su copia en RNA, se realiza en la cromatina extendida (figura 12-4). Los genes situados en la cromatina compacta no se expresan en la célula en cuestión, al menos en ese estado citofisiológico. Los genes situados en la eucromatina son potencialmente expresables y su transcripción dependerá de reguladores de la transcripción que realizan su función sin promover cambios del grado de compactación de la cromatina.

> Los genes situados en la cromatina compacta no se expresan en la célula.

> Los genes situados en la eucromatina son potencialmente expresables.

Existen dos tipos de cromatina compacta, la facultativa y la constitutiva. La primera corresponde a la descripción que hemos dado: contiene regiones del cromosoma que pueden estar activas —por lo tanto, en estado laxo— en algunos tipos celulares, e inactivas —compactadas— en otros tipos celulares, dentro del mismo organismo. Las regiones que componen la heterocromatina constitutiva están siempre compactadas en todas las células del organismo. Con respecto a su distribución en el genoma, la heterocromatina facultativa puede tener secuencias de uno de los miembros de un par alélico o bien estar todo el cromosoma condensado, mientras que el otro miembro del par puede no formar parte de cúmulos compactos semejantes. La heterocromatina constitutiva se encuentra siempre en ambos miembros de un par en todas las células del organismo y está formada por secuencias repetidas abundantemente, como son las regiones del cromosoma cercanas al centriolo. En algunos organismos, existen abundantes secuen-

> Existen dos tipos de cromatina compacta, la facultativa y la constitutiva.

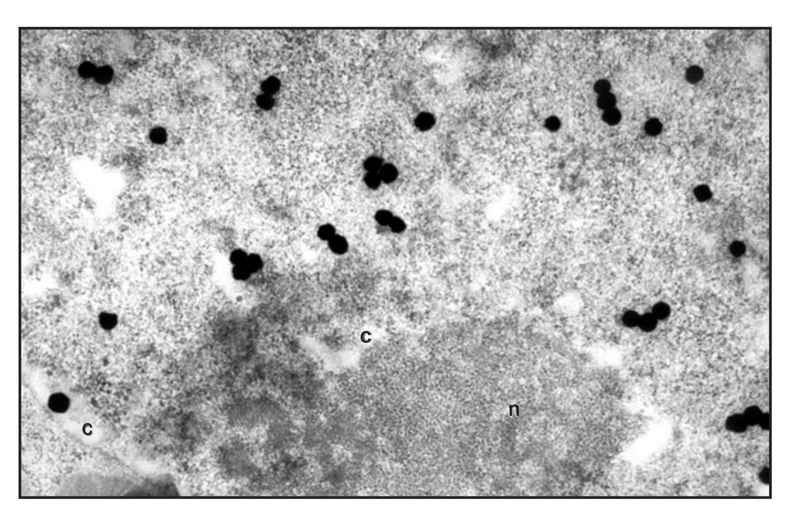


Figura 12-4. Micrografía electrónica de un hepatocito tratado con bleomicina al que se suministró uridina tritiada durante 30 minutos para demostrar los lugares de síntesis de RNA. El corte se cubrió con una emulsión nuclear de grano muy fino, especial para microscopia electrónica. Después de una exposición de varios meses se reveló en condiciones que no permiten crecer cada grano de plata de la emulsión, con el fin de obtener localizaciones muy precisas. Posteriormente, se contrastó con el procedimiento del acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo preferencial para RNA (Bernhard, 1969). Por esta razón, la cromatina compacta (c) que rodea al nucleolo (n), así como la que se encuentra adosada a la envoltura nuclear, se ven claras. Los gruesos granos negros de plata se distribuyen en la periferia de la cromatina compacta y en el espacio intercromatiniano o nucleoplasma.

cias de este tipo distribuidas en el genoma, por lo que presentan cúmulos de cromatina compacta en todas las células, incluyendo las que se caracterizan porque su cromatina está casi toda en forma laxa, como las neuronas.

Distribución en el espacio nuclear

La cromatina compacta se distribuye en grumos adosados a la envoltura nuclear, rodeando al nucleolo y distribuidos en el nucleoplasma. La eucromatina forma asas en la periferia de los cúmulos.

En la enorme mayoría de los núcleos interfásicos de hongos, plantas y animales, la cromatina compacta se distribuye en grumos adosados a la envoltura nuclear, rodeando al nucleolo y distribuidos en el nucleoplasma. La eucromatina forma asas en la periferia de los cúmulos. Estas asas se extienden en el nucleoplasma en longitudes variables. Esta disposición causa que la región que rodea a los grumos heterocromáticos sea donde radica la transcripción más activa, evidenciada por una rápida incorporación de uridina tritiada (Fakan y Bernhard, 1971). En plantas, la cromatina compacta puede distribuirse en dos formas diferentes, la cromocéntrica y la reticulada. La primera es la más frecuente en las dicotiledóneas, mientras que la reticulada es característica de las monocotiledóneas (figuras 12-5 y 12-6), de las criptógamas, de las briófitas y de las algas clorofíceas que se consideran posibles antepasados de las plantas.

La observación de los núcleos de las células de cualquier tejido de animales con microscopia óptica o electrónica permite el reconocimiento de tipos celulares. Esta comprobación de la práctica diaria indica que la arqui-

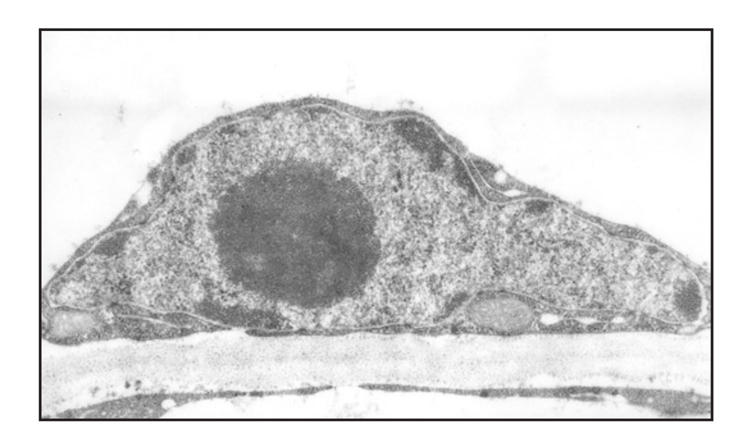
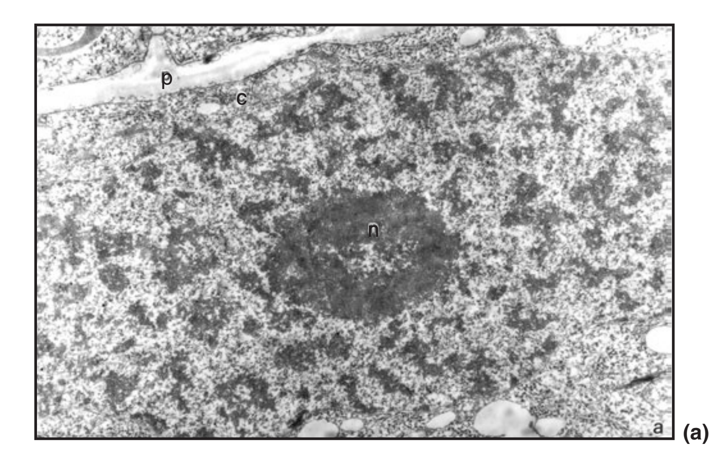
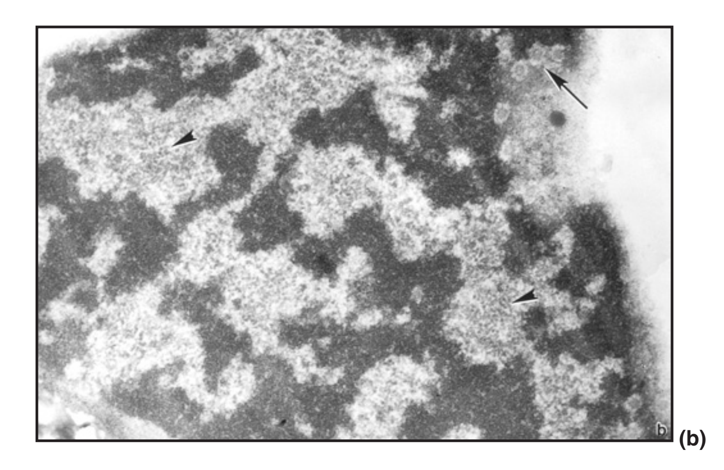


Figura 12-5. Núcleo de célula parenquimatosa de una planta dicotiledónea mostrando que la cromatina compacta se distribuye en pequeños cúmulos adosados a la envoltura nuclear dejando un amplio espacio central carente de cromatina densa, configurando así una disposición cromocéntrica.



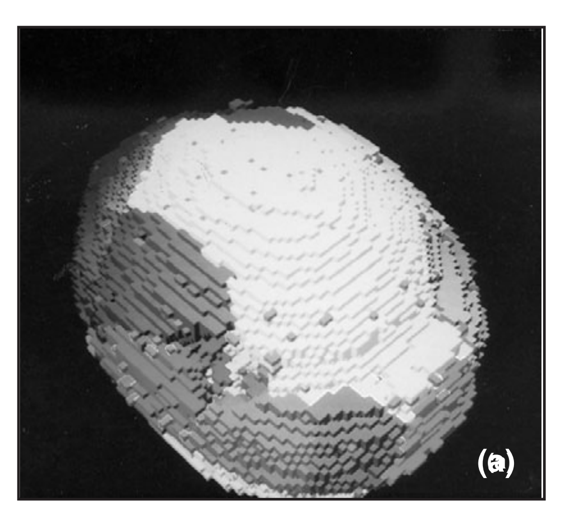
(a)



(b)

Figura 12-6. Núcleos de células con cromatina compacta en forma de retículo.
a) Meristemo de raíz de cebolla con cromatina reticular. n - nucleolo, c - citoplasma, p - pared celular.
b) Parénquima de *Lacandonia schismatica*. Las cabezas de flecha señalan gránulos ribonucleoproteicos situados en los espacios intercromatinianos. La flecha indica complejos de poros de la envoltura nuclear vistos de frente en el espesor del corte.

tectura nuclear, en especial la disposición de la cromatina compacta, no es al azar en la interfase. Hace más de cien años, Rabl sugirió que los cromosomas ocupan espacios diferentes en el núcleo interfásico y desde entonces se han realizado numerosos estudios que confirman esa hipótesis en plan-



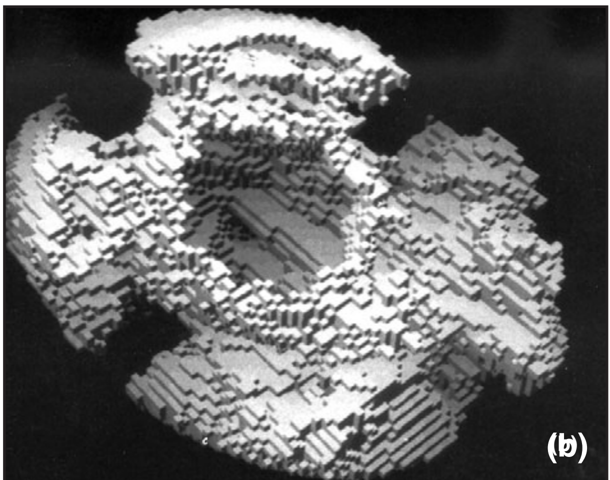


Figura 12-7. Reconstrucciones tridimensionales ayudadas por computadora a partir de micrografías electrónicas de cortes seriados teñidos con la técnica del PTA para cromatina. **a)** Aspecto externo en el que se ven las regiones en las que diferentes grumos de cromatina compacta se unen a la envoltura nuclear. Cada tono de gris representa el área de contacto de un grumo diferente. El tono más claro corresponde al cúmulo mayor, que es el que contiene al nucleolo. **b)** Corte del cúmulo de cromatina compacta que contiene al nucleolo (orificio central) mostrando 4 regiones de contacto con la envoltura nuclear. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

tas y animales, utilizando métodos muy diferentes. Sin embargo, la descripción de la posición de cada uno de los cromosomas en interfase no ha podido ser reconocida ni siquiera mediante reconstrucciones tridimensionales con el microscopio electrónico de toda la cromatina de núcleos del mismo tipo celular (figura 12-7) y en condiciones citofisiológicas similares (Esquivel y cols., 1989; López-Velázquez y cols., 1996). Las evidencias con que se cuenta hasta ahora (2002) parecen indicar la existencia de dos formas de distribución de la cromatina nuclear: la cromatina compacta que se agrupa en forma cromosómica y la cromatina laxa que se dispone en subcompartimentos funcionales. Los cromosomas durante la telofase se rodean de trozos de la futura envoltura nuclear y se descompactan parcialmente ocupando regiones definidas del espacio nuclear. Las regiones de cromatina densa originadas en un cromosoma o en algunos organismos en los dos cromosomas homólogos ocupan lugares contiguos que pueden llegar a reconocerse como un dominio nuclear con algunas técnicas. En esta forma, en la interfase se continúa la disposición mitótica de los cromosomas, en forma un tanto imprecisa, debido a la descompactación de zonas más o menos extensas de cada cromosoma (Driel y cols., 1995). Sin embargo, la cromatina laxa se arregla de una forma en gran medida diferente. Por ejemplo, los genes que organizan el nucleolo están distribuidos en diez cromosomas acrocéntricos en la especie humana y en todas las células metabólicamente activas se encuentran solamente dentro de los nucleolos, cuyo número varía entre uno y tres. En efecto, experimentos con hibridación *in situ* han mostrado que en la gran mayoría de las células no hay genes del

organizador nucleolar fuera de los nucleolos. Estos datos muestran que el nucleolo es un subespacio funcional del núcleo donde se transcribe y se procesa el RNA prerribosomal transcrito a partir del DNA de más de un cromosoma, y no corresponde, por lo tanto, al espacio de un cromosoma en particular.

Algunos núcleos especiales

En varios tejidos de las larvas de ciertos dípteros, el DNA sufre ciclos de duplicación sin separación de las dobles hélices hijas, de manera que todas quedan alineadas lado a lado formando un cromosoma gigante. En los núcleos interfásicos de los dípteros los cromosomas homólogos se encuentran generalmente apareados. Los cromosomas gigantes no son una excepción y están formados por los dos homólogos apareados punto a punto. Las células con más de dos copias del DNA correspondiente a cada cromosoma se llaman poliploides; en este caso, por la característica de quedar adosado el material genético en forma de un cromosoma de muchas hebras, se denominan cromosomas politénicos, es decir, con muchos hilos (figura 12-8).

Un cromosoma de muchas hebras, se denomina cromosoma politénico, es decir, con muchos hilos.

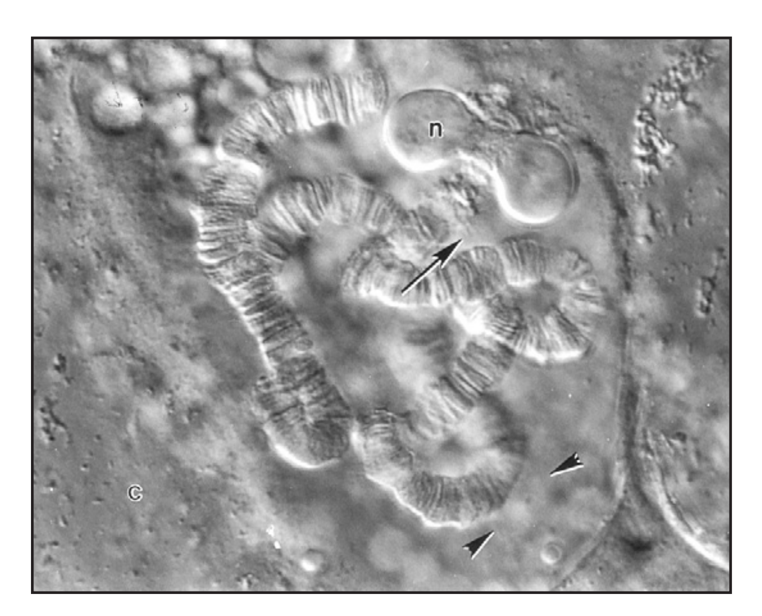


Figura 12-8. Micrografía óptica obtenida mediante contraste diferencial de interferencia, de un núcleo de la glándula salival de la larva de *Chironomus thummi*. Los cilindros flexuosos estriados son cromosomas gigantes interfásicos formados por numerosas dobles hélices, hasta 900 veces el juego haploide, conocidos, por esta razón, como cromosomas politénicos (muchos hilos). Cada uno está constituido por la fusión de un par de homólogos, de manera que el número de cromosomas (no de dobles hélices de DNA) es el haploide. El aspecto bandeado se debe a la alternancia de regiones de cromatina compacta y de cromatina extendida, llamadas bandas e interbandas respectivamente. n - nucleolo. La flecha señala una amplia zona de cromatina extendida, llamada anillo de Balbiani, situada en el cromosoma 4, el mismo que contiene el organizador nucleolar. Las cabezas de flecha señalan una región de cromatina extendida más pequeña que un anillo de Balbiani, llamada *puff*. c - citoplasma.

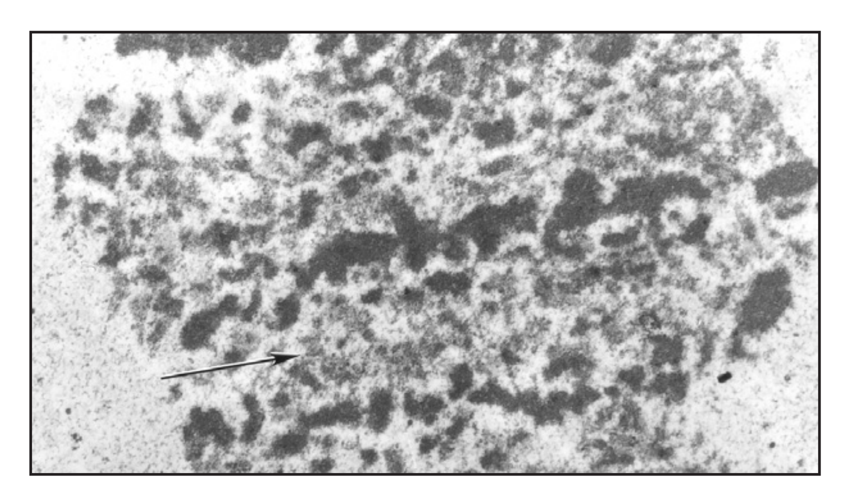


Figura 12-9. Micrografía electrónica de una parte de un cromosoma politénico mostrando las bandas de cromatina compacta y las interbandas formadas por un material finamente fibrilar (flecha).

Cuando un gen contenido en una banda se expresa en un estadio del desarrollo, la cromatina se extiende y forma una región clara de mayor diámetro que el cromosoma llamada *puff*.

Estos cromosomas están presentes en la interfase, ya que estas células no entrarán nuevamente en mitosis. En ellos existen regiones de cromatina compacta, que aparecen como bandas densas, y regiones eucromáticas de menor densidad que se llaman interbandas (figura 12-9). Cuando un gen contenido en una banda se expresa en un estadio del desarrollo, la cromatina se extiende y forma una región clara de mayor diámetro que el cromosoma llamada *puff*. Los anillos de Balbiani son regiones de máxima actividad de transcripción, en las que se encuentran cientos de RNA polimerasas simultáneamente. Se ven como grandes anillos claros que rodean al cromosoma y están formados por asas de cromatina muy extendida. El tamaño y la restringida localización espacial de los sitios genéticos inactivos y activos han motivado que los núcleos con cromosomas politénicos sean objeto de muchos trabajos destinados a esclarecer el funcionamiento del núcleo interfásico (Vázquez Nin y Echeverría, 1996).

Un ejemplo de cromosomas con funciones de intensa transcripción son los cromosomas plumulados de los ovocitos de anfibios en profase meiótica.

Otro ejemplo de cromosomas con funciones de intensa transcripción son los cromosomas plumulados de los ovocitos de anfibios en profase meiótica, por lo que no son estrictamente interfásicos. Estas células están en una etapa de crecimiento con muy activa síntesis de proteínas, aunque cada una de ellas está formada por un par de cromosomas homólogos unidos por los quiasmas. Cada cromosoma del par está, a su vez, constituido por dos cromátidas. La cromátida es una doble hélice de DNA unida a las proteínas propias de la cromatina interfásica. Su estructura presenta un eje que tiene alternativamente zonas compactas llamadas cromómeros y zonas intercromoméricas laxas. De los cromómeros nacen largas asas de cromatina extendida, que le dan el nombre a estos cromosomas. En las asas formadas por la fibra de 30 nm se lleva a cabo la transcripción de los genes (figura 12-10). La estructura general del cromosoma plumulado es similar a la propuesta para los cromosomas politénicos, para los mitóticos y

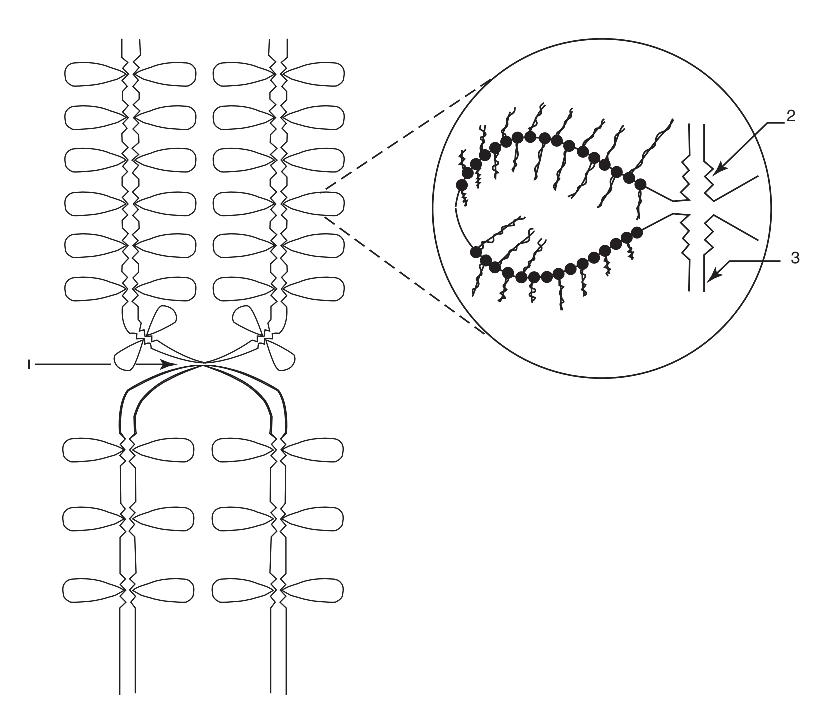


Figura 12-10. Estructura de un cromosoma plumulado. Estos cromosomas se encuentran en profase meiótica, por lo que están formados por el apareamiento de dos cromosomas homólogos, cada uno formado por dos cromátidas. Cada cromátida contiene una doble hélice de DNA. Las zonas plegadas 2) en las que se originan un par de asas simétricas, son los cromómeros y están formados por cromatina condensada. Las zonas de cromatina no plegada o laxa que las separan 3) son las regiones intercromoméricas. En 1) se muestra un quiasma. En el círculo se muestra a mayor aumento dos unidades matrices en las que se está sintetizando el RNA mensajero representado por las fibras laterales que se separan en ángulo recto de la doble hélice de DNA del asa y que tienen tamaño diferente. Las fibras más cortas muestran el extremo del gen donde comienza la síntesis del RNA y las más largas son las cercanas al lugar de finalización. Las esferas situadas sobre el asa en la base de cada molécula de RNA mensajero naciente representan al complejo de proteínas que acompaña a la RNA polimerasa II.

para la cromatina interfásica, en cuanto que están formados por un eje que mantiene la continuidad y la forma del cromosoma y de él parten asas de cromatina extendida que se transcriben. Las relaciones de este eje con la matriz nuclear son imposibles de establecer, dado que la casi totalidad de los estudios se han llevado a cabo mediante aplastados, que destruyen esas relaciones.

Otro tipo muy especial de núcleo es el de los espermatozoides, en especial los de mamífero. En ellos las histonas han sido sustituidas por protaminas, con lo que se logra un empaquetamiento del DNA mucho mayor. En efecto, el núcleo del espermatozoide de ratón es 40 veces menor que el de hígado, pero tiene solamente la mitad del DNA (Ward y Coffey, 1991). Las protaminas inducen arreglos lineales ondulantes lado a lado del DNA y no enrollamientos como las histonas, por lo que en los espermatozoides no hay nucleosomas (figura 12-11). La disposición lineal inducida por las

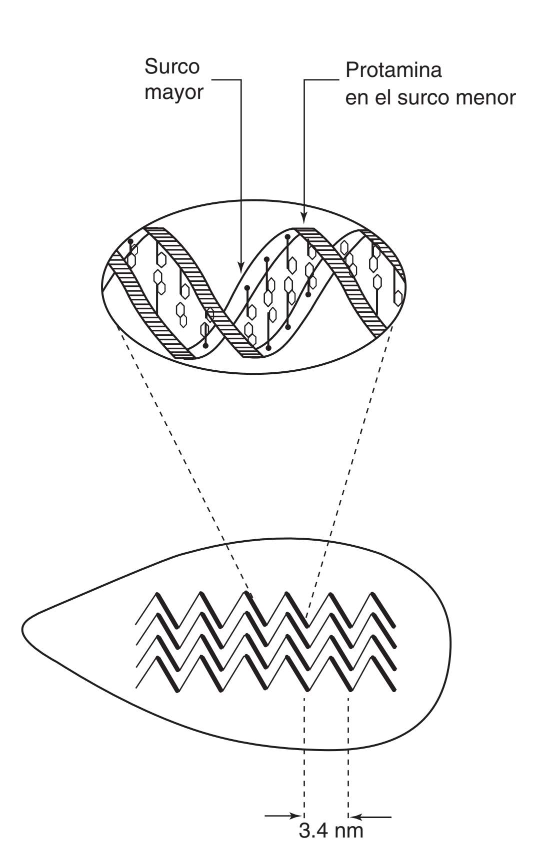


Figura 12-11. Esquema que muestra las relaciones de las protaminas y el DNA en espermatozoides. En la parte inferior se ve la disposición ondulada del complejo DNA-protamina, que tiene una cresta cada 3.4 nm. En la parte superior se puede observar que las moléculas de protamina se disponen en el surco menor del DNA.

protaminas produce un empaquetamiento, al menos seis veces más compacto que el de la fibra de 30 nm (Ward y Coffey, 1991). Cabe señalar que hay que tener en cuenta que en los espermatozoides no hay cromatina extendida, pues no hay transcripción.



Partículas ribonucleoproteicas no nucleolares

Los componentes ribonucleoproteicos nucleares externos al nucleolo son: las fibras pericromatinianas, los gránulos pericromatinianos, los gránulos intercromatinianos y los cuerpos espiralados.

Estas estructuras fueron caracterizadas cuando la citoquímica ultraestructural permitió la localización de los complejos de RNA y proteínas de tamaño menor a la décima parte de una micra. El uso de un procedimiento preferencial para la tinción de ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969), hidrólisis enzimáticas y extracciones químicas, permitió la clara demostración de la naturaleza ribonucleoproteica de varios componentes nucleares externos al nucleolo (Monneron y Bernhard, 1969). Éstos son: las fibras pericromatinianas, los gránulos pericromatinianos, los gránulos intercromatinianos y los cuerpos espiralados. Posteriormente se encontraron otras estructuras nucleares que probablemente también contengan RNA, los cuerpos nucleares, y se identificaron las polipartículas, que son componentes RNP no nucleolares previamente descritos por procedimientos bioquímicos.

Fibras pericromatinianas (FPC)

Fueron descubiertas por Monneron y Bernhard (1969), pues por primera vez se pudieron diferenciar de la cromatina usando el procedimiento de contraste que emplea acetato de uranilo, EDTA, y citrato de plomo de Bernhard (1969). Son fibras RNP de 3 a 5 nm de diámetro situadas preferencialmente en la periferia de algunos grumos de cromatina compacta, aunque también se encuentran en el nucleoplasma (figura 12-12). En núcleos con gran actividad de expresión de muy variados genes, como las células poco diferenciadas, la cromatina compacta es escasa y las FPCs se distribuyen homogéneamente ocupando la mayor parte del espacio nuclear con excepción del nucleolo.

La hipótesis inicial de que estas fibras representan la expresión morfológica de la transcripción (Monneron y Bernhard, 1969) fue corroborada por las variaciones de su cantidad como respuesta temprana a sustancias que inducen modificaciones de la síntesis del RNA (Petrov y Bernhard, 1971) y por la incorporación de uridina tritiada, luego de breves administraciones del precursor (Fakan y Bernhard, 1971). La demostración definitiva de que las FPCs contienen RNA pre-mensajero, también llamado heterogéneo nuclear (hnRNA), proviene de la correlación de estudios bioquímicos y ultraestructurales de fracciones de núcleos. En una de esas fracciones coexisten el hnRNA de marcado rápido y las FPCs (Bachellerie y cols., 1975; Fakan y cols., 1976).

Las fibras pericromatinianas representan la expresión morfológica de la transcripción del pre-mRNA.

El hnRNA es una copia del gen y está formado por secuencias en las que están codificadas partes de un polipéptido (exones) y otras (intrones) cuya secuencia de bases no corresponden a los ácidos aminados del polipéptido. Para que se forme el RNA mensajero maduro traducible por los ribosomas en secuencias de ácidos aminados, es necesario quitar los intrones y unir los exones. Este procesamiento se denomina *splicing*, término del inglés que emplearemos porque no encontramos un equivalente en español. Además del *splicing* la maduración del mensajero requiere otras dos transformaciones que son el agregado de capucha (cap) en el extremo 5' del RNA naciente y la adición de 100 a 200

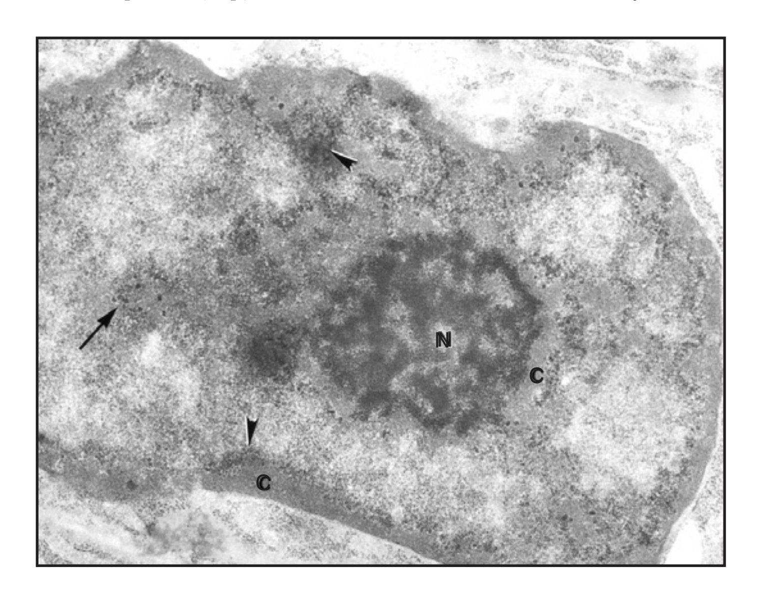


Figura 12-12. Micrografía electrónica de una célula del epitelio alveolar de la próstata ventral de la rata. En el núcleo se ven muy oscuras las partículas que contienen RNA, mientras que la cromatina compacta (C) se observa gris claro y sin estructura debido a que el procedimiento de contraste utilizado oscurece preferencialmente las estructuras ribonucleoproteicas. Las cabezas de flecha muestran cúmulos de fibras densamente teñidas, la mayoría de ellos situados en la periferia de grumos de cromatina compacta. Éstas son las fibras pericromatinianas. La fecha indica un cúmulo de gránulos pericromatinianos. La (N) señala el nucleolo con estructura nucleolonemal.

unidades de ácido adenílico (poli-A) al extremo 3'. La guanina de capucha deriva del GTP y se une con su extremo 5' al extremo 5' del RNA, luego se metila, así como también la primera base de hnRNA. Esta adición otorga estabilidad a la molécula, impidiendo su pronta degradación por RNAasas.

Los experimentos de Fakan y cols. (1984 y 1986) y los de Puvion y cols. (1984) demuestran que las fibras pericromatinianas son el lugar donde se lleva a cabo la mayor parte del *splicing* detectable con técnicas inmunocitoquímicas a nivel del microscopio electrónico. La morfometría de extendidos de complejos de transcripción en un sistema biológico que expresa muy pocos genes proporcionó datos que apoyan los resultados anteriores (Beyer y cols., 1980, 1981 y 1988; Osheim y cols., 1985). En estos estudios se demuestra que las fibras de RNA, aun unidas a la RNA polimerasa, crecen en longitud hasta cierto punto y luego disminuyen debido a la formación de un asa (intrón) y al corte de dicha asa (*splicing*). Estos resultados muestran que gran parte del quitado de intrones se produce durante la síntesis del RNA pre-mensajero, es decir, que es un fenómeno cotranscripcional. En la figura 12-13 se

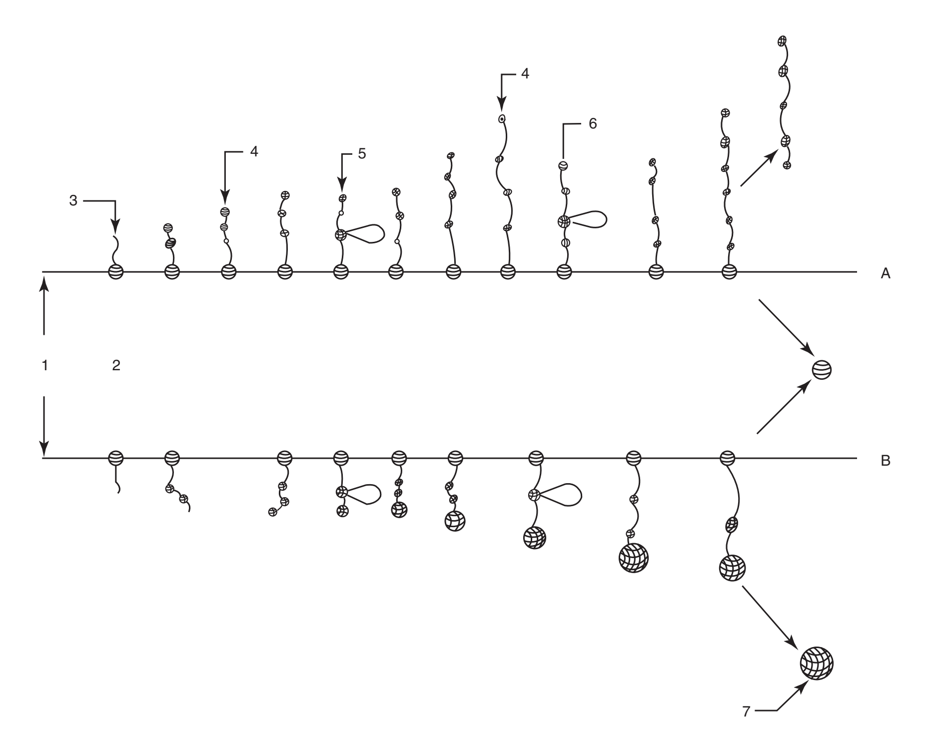


Figura 12-13. Esquema que muestra la formación y el *splicing* en dos RNA pre-mensajeros nacientes. En "A" la fibra ribonucleoproteica conteniendo el mRNA maduro no se pliega en forma de un gránulo pericromatiniano y al finalizar la transcripción difunde por el nucleoplasma como una fibra. En "B" la fibra ribonucleoproteica se va enrollando para formar un gránulo pericromatiniano a medida que es transcrita y procesada. 1- Doble hélice de DNA que va a transcribirse en pre-mRNA. 2- Complejo de proteínas que llevan a cabo la transcripción, incluyendo la RNA polimerasa II. 3- Molécula de pre-mRNA naciente. 4- Fibras con proteínas que se asocian al RNA naciente. 5- Fibra de pre-mRNA naciente que contiene un intrón formando un asa en la base de la cual hay una estructura compleja RNP llamada "spliceosoma" que producirá la escisión del mencionado intrón restableciendo la continuidad de las dos regiones adyacentes (exones). La fibra marcada con el número 4 situada a la derecha de la 5, contiene la secuencia de un intrón que todavía no está plegado en forma de asa. La fibra 6 es más corta que la 4 porque el intrón se ha plegado y va a ser quitado por acción del "spliceosoma" situado en la base del asa. 7- Gránulo pericromatiniano liberado de la unidad matriz al terminar la transcripción del mRNA.

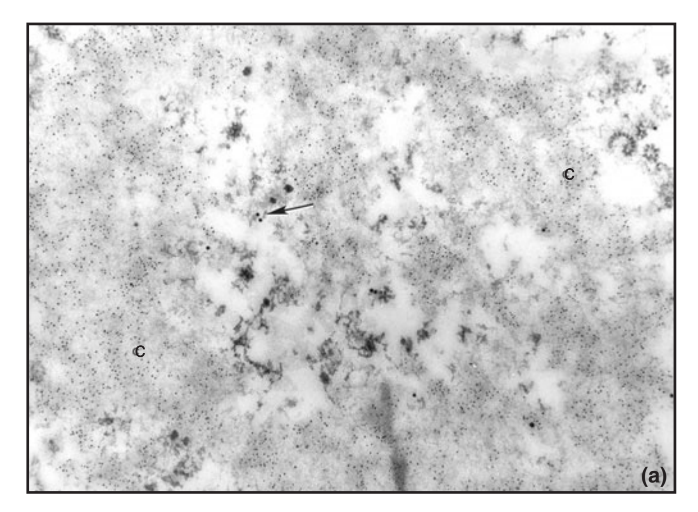
muestra que el *splicing* tiene lugar en una fibra pericromatiniana situada en el sitio de transcripción, antes de que ésta se pliegue para formar un gránulo. Esto se deduce de la inmunolocalización de proteínas que intervienen en dicho proceso. Sin embargo, en algunas unidades transcripcionales un porcentaje de las fibras no sufren ningún acortamiento y en otras unidades todas las fibras crecen en forma de un único gradiente de principio a fin, sin evidencia morfométrica de quitado de intrones. Estas observaciones confirman los datos bioquímicos de que el *splicing* no siempre es cotranscripcional. En efecto, este proceso puede tener lugar en forma postranscripcional en fibras RNP alejadas de la zona pericromatiniana, que corresponde al lugar de síntesis más activa de RNA.

Polipartículas

La extracción de núcleos purificados con cloruro de sodio 0.1M a pH 7.2, y posteriormente a pH 8, permitió la purificación de complejos ribonucleoproteicos que contienen mRNA (Samarina y cols., 1966). El análisis de esos complejos mediante centrifugación en gradientes de densidad determinó que están formados por partículas con un coeficiente de sedimentación 30S, llamadas informóferos (Samarina y cols., 1968). El estudio de dichas partículas con el microscopio electrónico demostró que tienen un tamaño único de alrededor de 25 nm (Monneron y Moulé, 1968). Posteriormente, mediante el uso de inhibidores de las RNAasas se encontró que las partículas 30S son una unidad que se repite múltiples veces para formar una estructura semejante a cuentas ensartadas en un hilo (Samarina y Krichevskaya, 1981; LeStourgeon y cols., 1981; Sommerville, 1981; Jacob y cols., 1981). El peso molecular de las proteínas que forman las partículas 30S se sitúa predominantemente entre 28,000 y 38,000 daltones. Cuando se analizan las estructuras en forma de sarta de cuentas, también llamadas polipartículas, se encuentran además varias proteínas de más de 40,000 daltones (Jacob y cols., 1981). Los RNAs contenidos en estas partículas son, en su mayoría, de alto peso molecular, con una secuencia de poli-A en el extremo 3' y de marcado rápido, es decir, mensajeros o pre-mensajeros (Samarina y Krichevskaya, 1981; LeStourgeon y cols., 1981; Jacob y cols., 1981). De hecho, se llegaron a identificar exones e intrones en las polipartículas (Samarina y Krichevskaya, 1981). El hallazgo de RNA de bajo peso molecular rico en uridina sugirió que al menos parte del procesamiento postranscripcional se lleva a cabo en las polipartículas. Sin embargo, se descartó la posibilidad de que estos RNAs de bajo peso molecular fueran un componente fundamental para conservación de la estructura de las partículas 30 a 50S (LeStourgeon y cols., 1981). En cuidadosos estudios con el microscopio electrónico de complejos transcripcionales de células de embriones de *Drosophila melanogaster*, extendidos utilizando detergentes y medios hipotónicos a pH básico, se determinó que las moléculas de RNA pre-mensajero aún unido a la matriz de DNA por la RNA polimerasa (RNA naciente), se unen a proteínas formando estructuras granulares de diversos tamaños (Beyer y cols., 1980). Estos gránulos no se forman en cualquier parte de la fibra de RNA, sino en lugares fijos que se repiten en muchas de las fibras de la misma unidad de transcripción y son diferentes de las posi-

ciones de las partículas de las fibras de otra unidad (Beyer y cols., 1981). Los gránulos de tamaño intermedio —20 a 35 nm— coinciden con la talla estimada de los informóferos o monopartículas. A menudo se observan gránulos de más de 35 nm de diámetro en la base de asas que se extienden a un lado de la fibra principal (Beyer y cols., 1981). Esos gránulos —también llamados "spliceosomas"— corresponden a los conjuntos de proteínas y RNAs de bajo peso molecular que intervienen en el proceso de quitado de intrones y empalme de los exones (Osheim y cols., 1985), lo que corrobora que gran parte del *splicing* es cotranscripcional (figura 12-13).

Asimismo, la observación con el microscopio electrónico de cortes de células parcialmente dispersadas por el empleo de una fijación aldehídica hipotónica, en presencia de un detergente a pH básico, demostró la presencia de estructuras fibro-granulares en forma de sarta de cuentas iguales a las encontradas en fracciones nucleares y denominadas polipartículas (Vázquez Nin y cols., 1989). Cuando los núcleos están moderadamente dispersados, la morfología de las polipartículas, así como su localización en la periferia de la cromatina compacta indican que corresponden a las fibras pericromatinianas (figura 12-14). Estos cortes de tejidos con las estructuras



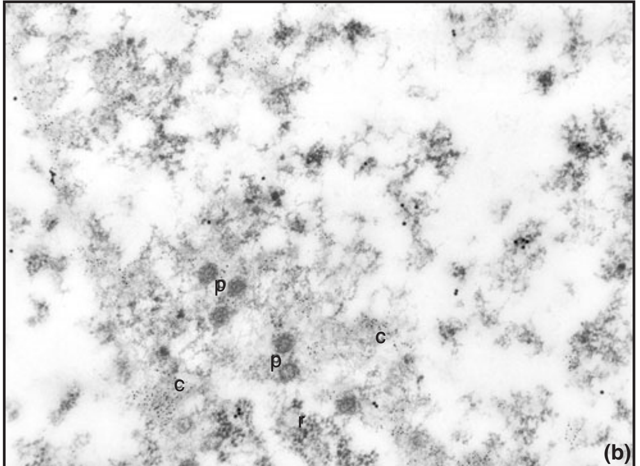


Figura 12-14. Núcleos de neuronas de cerebro de rata. El animal fue perfundido por vía cardiaca con formaldehído hipotónico a pH básico en presencia de un detergente para obtener una moderada descompactación de las estructuras nucleares. La localización del DNA se evidencia por inmunomarcado con gránulos de oro pequeños. El procedimiento de tinción evidencia las partículas ribonucleoproteicas en negro y la cromatina en gris claro. **a)** Muestra extensas zonas de cromatina (c) gris claro marcadas con los granos de oro pequeños. En el borde interno de los grumos de cromatina compacta se observan estructuras densamente teñidas eventualmente marcadas (flecha) con los granos de oro grandes. Éstas son partículas RNP que contienen mRNA. El detergente ha dispersado las dos membranas que forman la envoltura nuclear. En el citoplasma se observan conjuntos de ribosomas (polirribosomas) en forma de cadenas de gránulos. **b)** Los complejos de poro (p) han resistido a la extracción y aparecen de frente rodeados de cromatina, que se ve gris claro, marcada con los granos de oro pequeños y parcialmente dispersada por el tratamiento (c). Los granos de oro de mayor tamaño señalan las estructuras RNP que contienen mRNA y que se tiñen más oscuras que la cromatina. r - conjuntos de ribosomas en el citoplasma. Las membranas de la envoltura nuclear han sido dispersadas.

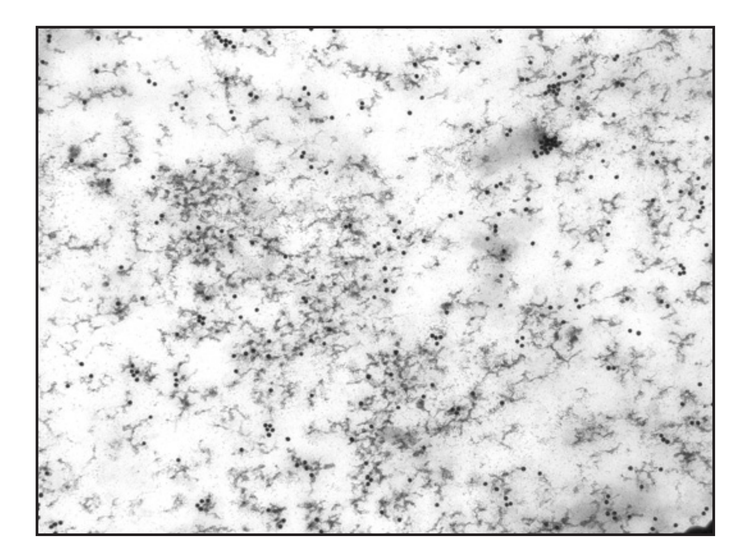


Figura 12-15. Núcleo de neurona de rata tratada como se describe en la figura anterior. Los granos de oro localizan proteínas relacionadas con el *splicing*. Muchas de estas proteínas están asociadas a las polipartículas que contienen los RNAs mensajeros nacientes, lo que indica que gran parte del quitado de intrones se lleva a cabo al mismo tiempo que la transcripción.

nucleares descompactadas muestran que las polipartículas son continuas con los GPCs, como son las FPC en los núcleos fijados en forma estándar (Vázquez Nin y cols., 1989). Estudios basados en el uso de inmunolocalización a nivel del microscopio electrónico (figura 12-15), enseñaron que en las fibras en forma de sarta de cuentas se localizan componentes del *splicing* y proteínas que se unen al RNA pre-mensajero (Vázquez Nin y cols., 1994). De esta forma, se corrobora la correspondencia morfológico-funcional entre una partícula aislada por métodos destructivos y una estructura analizada *in situ*. La aplicación del método de la dispersión parcial a núcleos vegetales cromocéntricos (*Lycopersicon esculentum*, tomate, dicotiledónea) demostró la existencia de las polipartículas en vegetales y puso de manifiesto que estas estructuras han sido muy conservadas durante la evolución (Vázquez Nin y cols., 1992).

La inmunolocalización de factores de *splicing*, de la RNA polimerasa II y de proteínas relacionadas con los pre-mRNAs demostró una cercana asociación de los sitios de transcripción y de *splicing*, así como también la existencia de una migración de los factores de *splicing* hacia los lugares en donde se inicia o se activa la transcripción (Jiménez-García y Spector, 1993).

Gránulos pericromatinianos (GPC)

Los gránulos pericromatinianos fueron descritos por primera vez por Watson (1962).

La morfología y citoquímica de estos gránulos fue definida por Monneron y Bernhard (1969), quienes los describieron como cuerpos esféricos de 30 a 50 nanómetros (nm) de diámetro rodeados de un halo claro de 20 a 25 nm (figuras 12-12 y 12-16). La naturaleza ribonucleoproteica de los GPCs fue demostrada por primera vez por Monneron y Bernhard (1969) mediante un procedimiento preferencial para el contraste de ribonucleoproteínas (RNP)

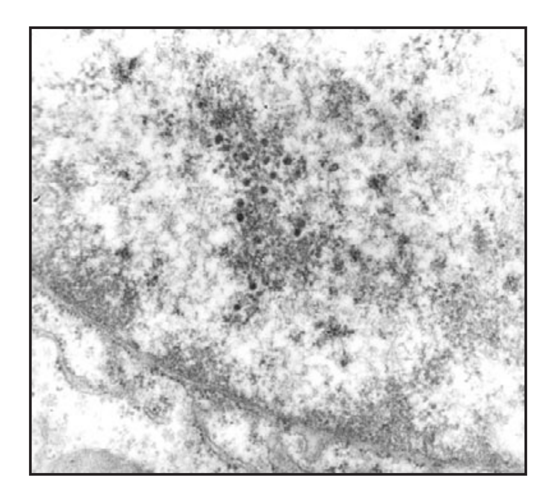


Figura 12-16. Núcleo de hígado de rata en el que se puede observar un grupo de gránulos pericromatinianos, cercanos a un cúmulo de cromatina compacta y rodeados por sus halos claros.

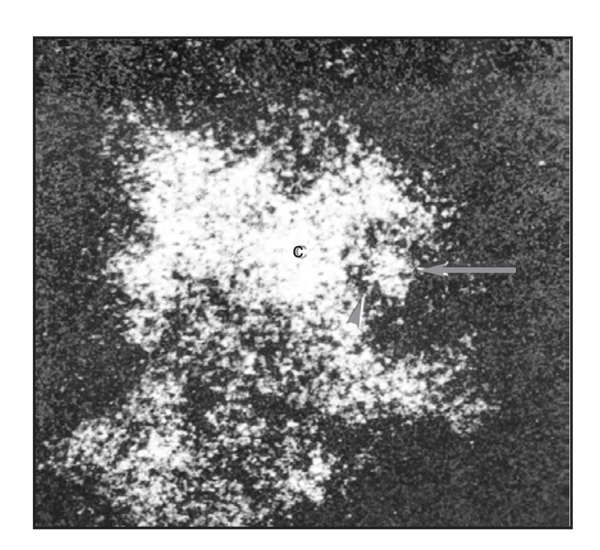


Figura 12-17. Imagen espectroscópica de energía de electrones de un gránulo pericromatiniano de hígado de rata a gran aumento. Las estructuras claras son las que contienen concentraciones altas de fósforo. Los compuestos que contienen más fósforo en los núcleos de las células son los ácidos nucleicos. Las delgadas fibrillas que forman el gránulo pericromatiniano (flecha) se ven blancas debido a la alta concentración de RNA que hay en ellas. La cromatina compacta (c) contiene DNA dispuesto en forma muy densa, por lo que aparece brillante. El halo que rodea al GPC está atravesado por fibrillas (cabeza de flecha) que contienen RNA.

(Bernhard, 1969), complementado por el empleo de hidrólisis enzimáticas y extracciones químicas.

La subestructura de los GPCs está compuesta por una fibrilla de 3 nm de diámetro, retorcida dentro del gránulo (Monneron y Bernhard, 1969). Recientemente, el uso del microscopio electrónico provisto de filtro de energía de electrones ha permitido demostrar la arquitectura atómica de varias estructuras nucleares, entre ellas, la de los GPCs (Vázquez Nin y cols., 1996). La realización de cartografías de los átomos de fósforo demostró que el ácido ribonucleico (RNA) se distribuye dentro de los GPCs en forma de fibrillas de 2 a 3 nm (figura 12-17). Las imágenes de fondo oscuro que muestran la distribución de densidades, independientemente de los átomos que las producen, ponen de manifiesto el conjunto del RNA y sus proteínas asociadas en forma de fibrillas de 4 a 5 nm (Vázquez Nin y cols., 1996). Estos mismos métodos revelaron la existencia de un ciclo de formación y maduración de los GPCs en hígado de rata (Vázquez Nin y cols., 1996), confirmando

que los GPCs se originan por el enrollamiento de una fibra pericromatiniana, como estaba descrito en el caso de los gránulos de los anillos de Balbiani (Vázquez Nin y Bernhard, 1971).

Los GPCs se originan por el enrollamiento de una fibra pericromatiniana.

Monneron y Bernhard (1969) postularon que estos gránulos se relacionan con el transporte de información del núcleo al citoplasma y que contienen posiblemente mRNA. Comparaciones morfológicas, morfométricas y citoquímicas de los GPCs con los gránulos de Balbiani demostraron que ambos tipos de estructuras son esencialmente idénticas (Vázquez Nin y Bernhard, 1971). Estos resultados condujeron a los autores a sostener que ambos tipos de gránulos cumplen la misma función en diferentes tipos celulares. Ésta es la de almacenar RNA de alto peso molecular pre-mensajero (Vázquez Nin y cols., 1971). Sin embargo, se requirieron pruebas citoquímicas y funcionales para corroborar esta hipótesis. El empleo de estos procedimientos dio lugar a dos tipos de experimentos: los que utilizan factores físicos o químicos que alteran el metabolismo del RNA y los que emplean hormonas normales en los organismos para inducir variaciones reversibles del metabolismo del RNA.

Los experimentos que involucran el uso de drogas que alteran el metabolismo, como la cicloheximida (Moyne y cols., 1977), cordicepina (Puvion y cols., 1976), ribósido de dicloro benzimidazol (Puvion y cols., 1979), cloruro de cadmio (Puvion y Lange, 1980) o choque hipotérmico (Puvion y cols., 1976), muestran importantes cambios de la frecuencia de GPC (Fakan y Puvion, 1980; Puvion y Moyne, 1981; Fakan, 1986). Estos hallazgos corroboran la hipótesis de Monneron y Bernhard (1969), pero no aportan datos complementarios, pues dañan diversos pasos metabólicos.

Los experimentos realizados con hormonas consistieron en estudiar, en el órgano blanco de una hormona, la densidad numérica de los GPCs, mediante estereología cuantitativa ultraestructural y simultáneamente estimar la síntesis y el transporte del RNA del núcleo al citoplasma, mediante autorradiografía cuantitativa. Para marcar el RNA, se administró uridina tritiada, en animales normales y en animales hormonoprivos con y sin tratamiento de restitución de la hormona. Los efectos del tratamiento se evaluaron a varios tiempos después de la administración de la hormona correspondiente. La ovariectomía y la inyección de estradiol de rápida metabolización (hemisuccinato de 17β estradiol) demostraron por primera vez que la frecuencia de los GPCs aumenta muy significativamente con la supresión de la hormona y que 15 minutos después de la administración de estradiol dicha frecuencia desciende a niveles mucho más bajos que los normales (Vázquez Nin y cols., 1978). En los animales hormonoprivos tratados con la hormona, el número de GPC se mantiene bajo durante aproximadamente dos horas y luego recupera los niveles normales. Posteriormente, la densidad numérica de los GPCs va aumentando progresivamente hasta el nivel de castración, a medida que la hormona es metabolizada y desaparece de la sangre (figura 12-18). Sin embargo, el volumen nucleolar, así como la frecuencia de otras partículas RNP, no presentan el comportamiento, aparentemente anómalo, de aumentar cuando la síntesis de RNA disminuye por la ovariectomía y de disminuir cuando la transcripción se incrementa

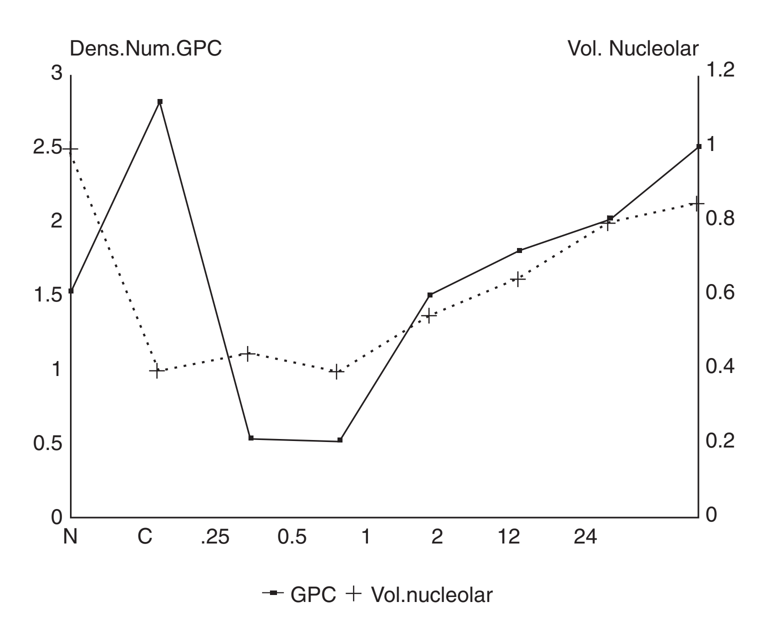


Figura 12-18. Efecto de la ovariectomía y la restitución de estradiol sobre el número de GPC y el volumen nucleolar en las células epiteliales del útero de rata. El eje de ordenadas de la izquierda está calibrado en número de GPC por micra cuadrada de núcleo, lo que se conoce como densidad numérica de los GPC. El eje de la derecha en micras cúbicas. En la abscisa: N = rata normal; C = rata ovariectomizada (castrada) 21 días antes del estudio. De .25 a 24 = horas después de la inyección de estradiol. La línea continua muestra la variación de la densidad numérica de los GPCs. La línea de puntos indica las alteraciones del volumen nucleolar.

debido a la administración de estradiol. El volumen nucleolar, por ejemplo, se reduce significativamente en los animales ovariectomizados y se recupera lentamente después de la administración hormonal (figura 12-18). Estas observaciones sugirieron que el número de los GPCs está regulado por la relación entre la síntesis de RNA y su salida al citoplasma, y permitieron formular la hipótesis de que el estradiol tiene un efecto postranscripcional sobre la expresión genética, regulando la velocidad del pasaje de los mRNAs del núcleo al citoplasma (Vázquez Nin y cols., 1978). Para demostrar o refutar esta hipótesis, se llevaron a cabo estudios sobre la dinámica de la síntesis del RNA y de su migración al citoplasma, mediante autorradiografía ultraestructural cuantitativa, empleando células epiteliales endometriales de rata en cultivo primario (Vázquez Nin y cols., 1979). Estos experimentos demostraron, por un lado, que los efectos del estradiol sobre la frecuencia de los GPCs se deben a una acción directa sobre las células blanco y, por otro lado, que existe un aumento de la migración de RNA del núcleo al citoplasma, que se produce inmediatamente después del agregado de hemisuccinato de 17β estradiol al medio de cultivo (figura 12-19). Para demostrar este último punto se realizaron pares de cultivos provenientes de un mismo grupo de células en suspensión obtenidas de 4 cuernos uterinos de ratas ovariectomizadas 21 días antes. Se marcaron ambos miembros del par de cultivos con uridina tritiada durante unos minutos en ausencia de estradiol. Luego, se sustituyó el medio de cultivo por otro que contenía uridina sin marcar y solamente a uno de los cultivos se le agregó estradiol durante este periodo de caza metabólica (*chase*). El cultivo tratado con estradiol presentó mucho más marcado citoplasmático que el no tratado durante el periodo de caza (figura 12-19). Esto demuestra que la administración hormonal aumenta la velocidad de salida al citoplasma de las moléculas de RNA sintetizadas antes del tratamiento. El hecho de que se retirara la uridina tritiada antes de agregar el estradiol excluye que la causa del aumento de la marca citoplas-

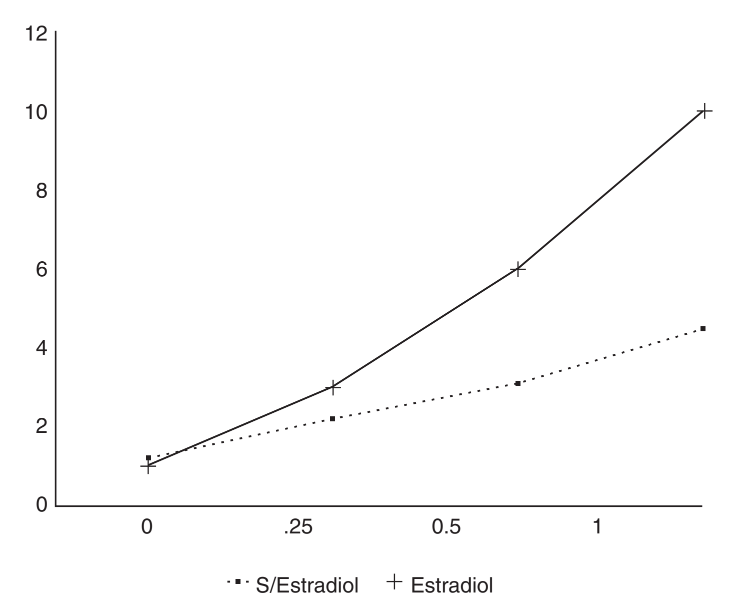


Figura 12-19. Efectos de la administración de estradiol a un cultivo de células epiteliales de útero de rata ovariectomizada 21 días antes de la puesta en cultivo. La ordenada está calibrada en granos de plata por micra cuadrada, es decir, densidad numérica de la marca en el citoplasma. Cada grano de plata corresponde a una desintegración del tritio de la uridina incorporada en el RNA que ha migrado al citoplasma, es decir, en el RNA sintetizado *antes* de la administración del estradiol. A la hora cero se cambia el medio de cultivo por otro con uridina *sin* tritio y con estradiol en uno de los dos cultivos de cada par. Esta incubación en medio de cultivo con uridina sin tritio se llama caza. En la abscisa se representan las horas de caza. La línea punteada indica la actividad radiactiva en el citoplasma de la célula cuya caza se desarrolla en ausencia de estradiol y la línea continua muestra el incremento de RNA marcado en el citoplasma de las células cuya caza se realizó en presencia de estradiol.

mática sea un posible incremento de la transcripción, puesto que, aunque ese aumento existiera, no sería visible, dado que las moléculas de RNA sintetizadas no estarían marcadas (Vázquez Nin y cols., 1979). El conjunto de estos resultados demuestra la hipótesis que sostiene que el estradiol tiene un efecto postranscripcional sobre la expresión genética modulando la velocidad de salida de los mRNAs del núcleo al citoplasma.

Cuando se compararon la densidad numérica de los GPCs y el marcado autorradiográfico del núcleo y del citoplasma de células epiteliales de la próstata ventral, en ratas normales y en castradas, sin y con un tratamiento de hemisuccinato de testosterona, se encontró que la frecuencia de GPCs aumenta con la castración y disminuye media hora después de la administración de la hormona (Echeverría y cols., 1991). En estos casos, también el volumen nucleolar disminuye con la castración y aumenta muy lentamente con el tratamiento (figura 12-20). Estos resultados se acompañan con un aumento del marcado citoplasmático con respecto al nuclear en los animales hormonoprivos tratados en relación con los no sometidos a tratamiento (figura 12-21).

El significado citofisiológico de las variaciones del volumen nucleolar fue estudiado en diversas células animales y vegetales, empleando procedimientos similares a los utilizados en los estudios de los GPCs. Estas investi-

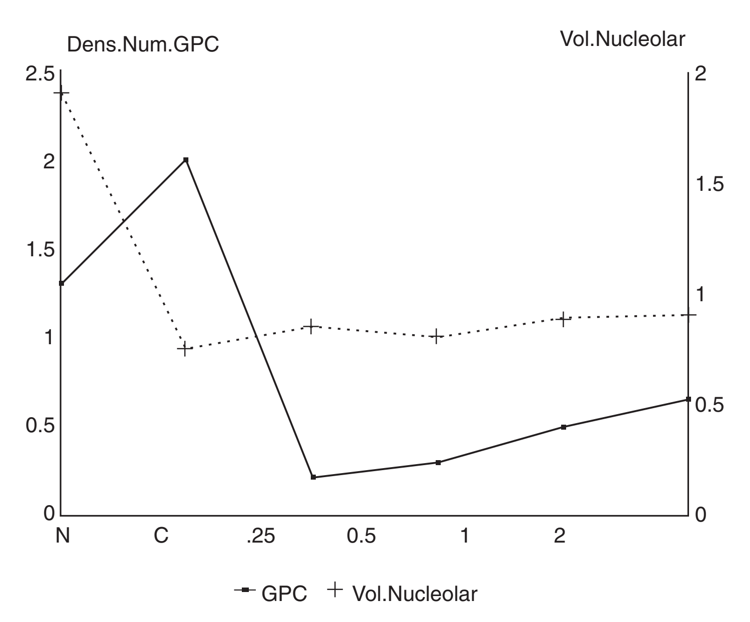


Figura 12-20. Efecto de la testosterona sobre la densidad numérica de GPC y el volumen nucleolar en el epitelio alveolar de la próstata ventral de la rata. El eje de ordenadas de la izquierda está calibrado en GPC/Área, el de la derecha está calibrado en micras cúbicas. En la abscisa, N = ratas normales; C = Castradas. De .25 a 2 = horas después de la inyección de testosterona en la rata castrada. La línea continua muestra la variación de la densidad numérica de los GPCs. La línea de puntos indica las alteraciones del volumen nucleolar.

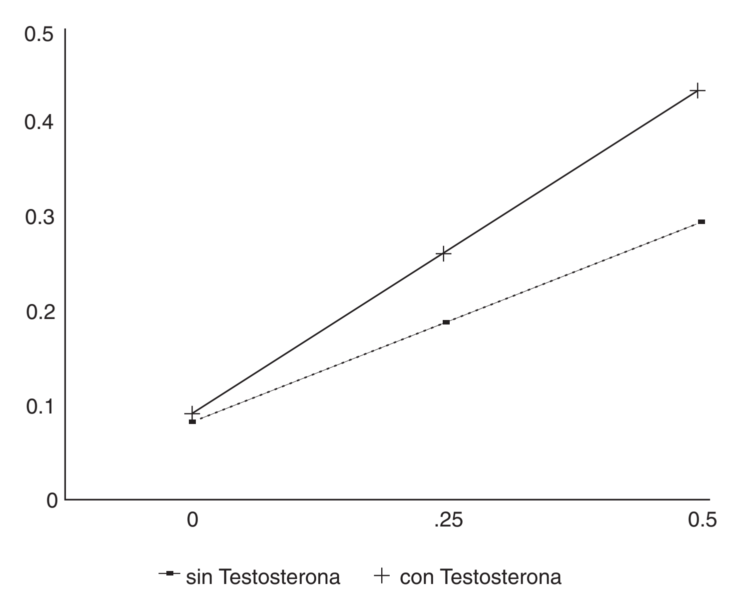
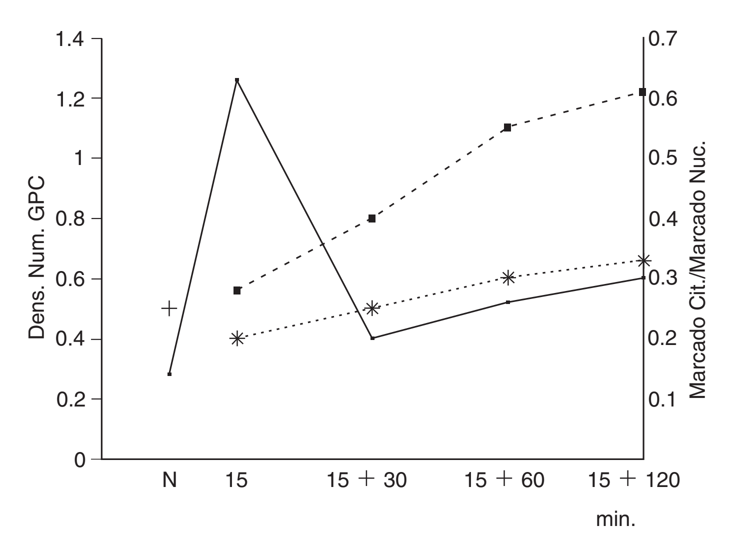


Figura 12-21. Efecto de la testosterona sobre el transporte de RNA del núcleo al citoplasma en las células epiteliales alveolares de la próstata ventral de la rata castrada 3 semanas antes del experimento. La ordenada muestra el cociente entre la densidad de marca en el citoplasma dividida entre la densidad de marca en el núcleo. La abscisa expresa las horas después de la administración de testosterona. La línea continua muestra los especímenes castrados que recibieron testosterona y la punteada los castrados sin reposición hormonal.

gaciones demostraron que el volumen nucleolar sigue los cambios de la transcripción, sin que se hayan encontrado signos de la presencia de un control de la velocidad de salida al citoplasma de los RNA ribosomales (Vázquez Nin y cols., 1986). Por esta razón, el volumen nucleolar ha sido usado como un control negativo válido en los estudios de las variaciones de la densidad numérica de los GPCs.

Para comprobar si la capacidad de acelerar muy rápidamente la salida de los mRNAs previamente sintetizados es exclusiva de algunas hormonas esteroides o es una propiedad más general de los GPCs, se estudiaron los efectos de cuatro hormonas polipeptídicas hipofisiarias sobre sus células diana utilizando el mismo esquema experimental (Vázquez Nin y cols., 1997). Se emplearon ratas macho y las hormonas fueron: la folículo estimulante (FSH) que tiene efectos sobre las células de Sertoli del testículo, la luteinizante (LH) que ejerce sus acciones sobre las células de Leydig de ese mismo órgano, la tirotrópica (TSH) cuyo blanco son las células epiteliales de los folículos tiroideos y la adrenocorticotrópica (ACTH) que actúa sobre las células de la zona fasciculata de la corteza suprarrenal. En todos los casos se demostró que la supresión de la hormona produce un aumento del número de los GPCs, acompañado de una disminución de la transcripción, mientras que la reposición de la hormona correspondiente, causa una disminución rápida de la frecuencia de los GPCs y un incremento de la migración de los mRNAs hacia el citoplasma, que se expresa en el aumento en la relación entre el marcado citoplasmático y el marcado nuclear (figura 12-22).

Del conjunto de estos hallazgos se puede deducir que el número de GPC está regulado por la relación entre síntesis del pre-mRNA y la exportación del mRNA maduro hacia el citoplasma. Por otra parte, esos resultados muestran que hormonas que actúan por medio de mecanismos intermedios muy diferentes producen efectos muy similares sobre el transporte de los mensajeros hacia el citoplasma. Es bien conocido que las hormonas esteroides modulan numerosas actividades de las células blanco, modificando la actividad genética de las mismas (Yamamoto, 1985) mediante la unión del complejo hormona-receptor con el DNA y con varias proteínas dentro del núcleo (Truss y Beato, 1993). La respuesta celular es causada por la interacción del complejo hormona-receptor con regiones reguladoras de los genes sensibles a la hormona, dentro de las células blanco específicas (Truss y Beato, 1993). Sin embargo, las hormonas polipeptídicas hipofisiarias se unen a receptores situados en la membrana celular y desencadenan sus acciones por medio de segundos mensajeros (Misrahi y cols., 1992 y 1993; Saez, 1994; Segaloff y Ascoli, 1993). Hace más de 30 años se sabe que hormonas como la FSH y la TSH, incrementan la acumulación de AMP-cíclico (AMPc) en las células blanco y estimulan la adenil ciclasa (Urquhart, 1974). La FSH, al interactuar con su receptor, incrementa los niveles de AMPc en las células de Sertoli y activa una cinasa dependiente de dicho nucleótido (Leung y Steele, 1992). La LH es indispensable para el mantenimiento de la estructura y las funciones de las células de Leydig (Saez, 1994) y produce sus efectos a través del metabolismo del AMPc (Dufau y cols., 1980). La



La línea punteada representa a ratas hipofisectomizados sin tratamiento
La línea de guiones representa a ratas hipofisectomizadas tratadas
La línea continua representa la densidad numérica de los GPC

Figura 12-22. Efecto de las hormonas hipofisiarias sobre la densidad numérica de GPC y la salida de RNA del núcleo al citoplasma en sus órganos blanco. Aquí se muestra el efecto de la hormona folículo estimulante sobre las células de Sertoli del testículo a manera de ejemplo. El eje Y de la izquierda está calibrado en número de GPC por micra cuadrada (densidad numérica), el de la derecha indica el cociente de la densidad de marca en el citoplasma entre la del núcleo. En la abscisa: N = ratas normales, 15 = minutos de marcado con uridina tritiada. 15 + 30 hasta 15 + 120 = minutos de cultivo en presencia de la hormona FSH y de uridina *sin* tritio. La cruz situada sobre la N indica el cociente entre el marcado del citoplasma y del núcleo en la rata normal al finalizar los 15 minutos de incorporación.

tirotropina activa la adenilciclasa y la fosfolipasa C, la cual induce la cascada del fosfatidilinositol 4,5-difosfato (Allgeier y cols., 1994; Shaver y cols., 1993). Aunque generalmente se admite que el AMPc media la acción de la ACTH (Urquhart, 1974), los movimientos de iones a través de la membrana de las células de la zona fasciculata de la corteza suprarrenal, producen una depolarización de dicha membrana que controlaría la función endocrina de las mencionadas células (Lymangrover y cols., 1982).

El hecho de que los dos tipos de hormonas actúen mediante mecanismos tan diferentes, pero que coincidan en sus efectos sobre la regulación del pasaje de los mRNAs por el poro de la envoltura nuclear sugiere que éste es un mecanismo de control postranscripcional de la expresión genética muy frecuente en la naturaleza. Para poner a prueba esta idea se llevaron a cabo investigaciones de las variaciones de la frecuencia de los GPCs durante los cambios de la expresión genética no reversibles, que suceden durante el desarrollo embrionario.

El estudio en el embrión de pollo de la diferenciación de las células matrices del sistema nervioso en neuroblastos y de éstos en neuronas inmaduras, y del proceso de maduración morfológico-funcional de las neuronas, permitió observar las correlaciones de las variaciones de la frecuencia de los

GPCs con etapas de estos procesos, tales como la pérdida irreversible de la capacidad mitótica (diferenciación de la célula matriz en neuroblasto), el comienzo de la síntesis de proteínas específicas (diferenciación neuroblasto bipolar en multipolar), y los cambios que acompañan la interconexión de las neuronas durante la sinaptogénesis. La evaluación de los cambios de la frecuencia de los GPCs demostró que las etapas fundamentales de la diferenciación celular no se acompañan de un incremento de la población de dichos gránulos. Sin embargo, durante la sinaptogénesis sucede un aumento muy grande de la frecuencia de los GPCs, que no está acompañado de variaciones importantes del volumen nucleolar, ni de la abundancia de otras partículas RNP, como se pone de manifiesto en la figura 12-23 (Vázquez Nin y

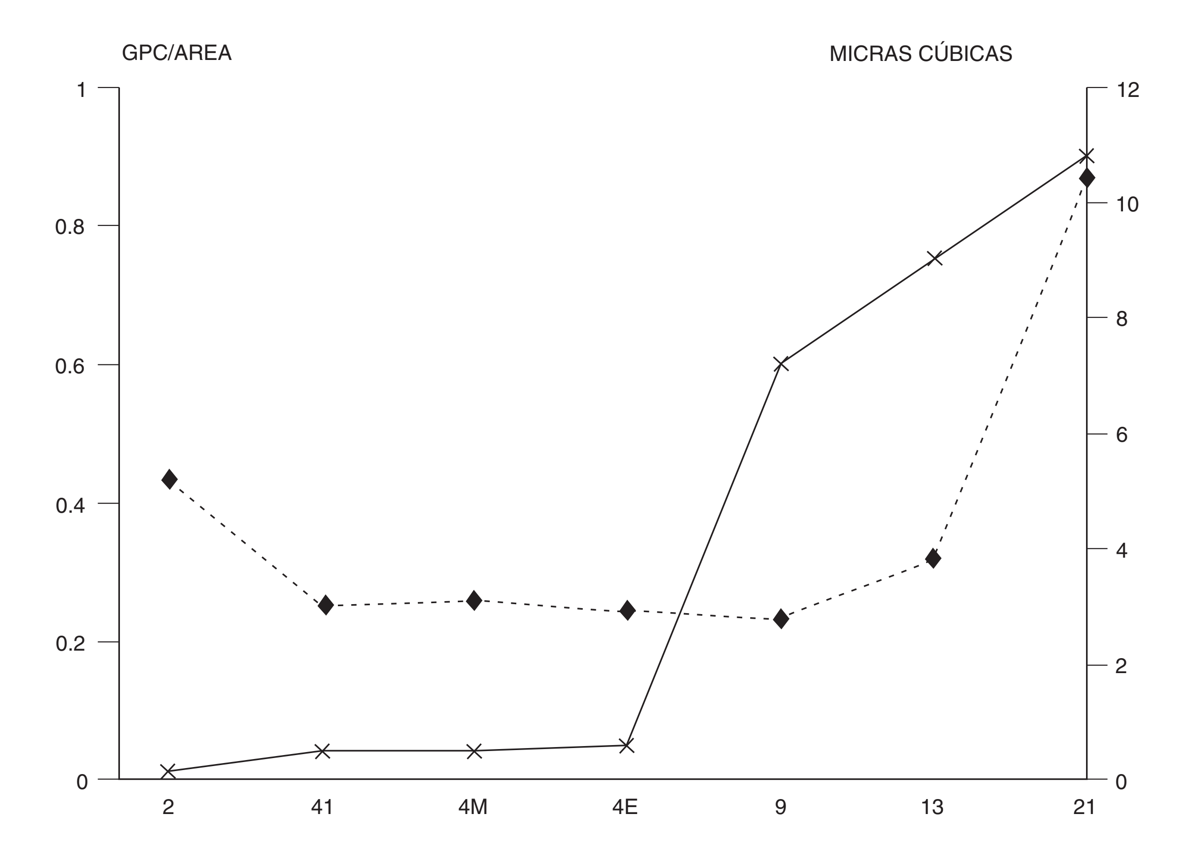


Figura 12-23. Cambios de la densidad numérica de GPC y del volumen nucleolar durante la diferenciación y maduración funcional de los neuroblastos del embrión de pollo. En la abscisa: 2 = células matrices en el embrión de 2 días de incubación; 4I = células matrices en la capa interna o ependimal del tubo neural de embriones de 4 días de incubación; 4M = neuroblastos bipolares (posmitóticos) en las capas intermedias del tubo neural del embrión de pollo de 4 días de incubación; 4E = neuroblastos bipolares en las capas externas anteriores del tubo neural del embrión de pollo de 4 días de incubación; 9 = motoneuronas inmaduras conectándose sinápticamente con la periferia (músculo) en el embrión de pollo de 9 días de incubación; 13 = motoneuronas de embrión de pollo de 13 días de incubación; 21 = motoneuronas de pollo recién salido del cascarón.

cols., 1980 y 1983). Se realizaron hallazgos similares cuando se investigó la diferenciación de los mioblastos en fibras musculares estriadas y la maduración funcional de las mismas. El gran aumento de la densidad numérica de los GPCs se produce también durante la sinaptogénesis (Zavala y cols., 1992).

La demostración de que algunas células poco diferenciadas, como las células matrices del sistema nervioso y los mioblastos, tienen muy pequeñas cantidades de GPC, siendo células en rápida reproducción mitótica y que, por lo tanto, deben duplicar todo el contenido celular, sugiere que no todos los mensajeros adquieren la estructura de un GPC. Los GPCs se forman por el plegamiento de las fibras pericromatinianas (Vázquez Nin y Bernhard, 1971; Vázquez Nin y cols., 1996). Sin embargo, muchas de las fibras pericromatinianas pueden no plegarse en forma de GPC y migrar dentro del núcleo hasta llegar al poro, como lo sugieren las observaciones autorradiográficas de Puvion y Moyne (1978). Todas estas observaciones indican que probablemente los GPCs son un almacén de algunos tipos de mRNA, pero no de todos ellos, ya que hay células metabólicamente muy activas en las que son muy escasos, y que las fibras pericromatinianas pueden llegar a los poros sin pasar por la forma granular. El hecho de que las células diferenciadas contienen muchos más GPCs que las poco diferenciadas, sugiere que los GPCs contienen mRNA en los que están codificadas las proteínas del estado diferenciado, es decir, las proteínas que la célula madura sintetiza abundantemente. Se puede formular la hipótesis de que los mensajeros de dichas proteínas están sometidos a un control que enlentece su salida al citoplasma y, de esta forma, se crea una reserva intranuclear de dichos mensajeros. Los experimentos de Edström y Tanguay (1974) demuestran que en las células de las glándulas salivales de *Chironomus*, que tienen cromosomas politénicos, los mensajeros de las proteínas de la saliva demoran mucho más que los de las proteínas del metabolismo general en salir al citoplasma. Estas observaciones confirman la hipótesis de que los mensajeros de las proteínas de la saliva se incorporan a un gran almacén formado por los gránulos de Balbiani, antes de ser exportados del núcleo. El recambio de dicho almacén es muy lento debido al control restrictivo de la velocidad de salida, mientras que los mRNAs de las proteínas del metabolismo general migran al citoplasma inmediatamente sin ser almacenados.

Si bien hay acuerdo en que los GPCs contienen mRNA, ha existido la duda de si éste es maduro, es decir, sin intrones, o si los GPCs contienen RNA pre-mensajero aún sin procesar. La observación más concluyente que apoya la hipótesis de que los GPCs contienen mRNA maduro, sin intrones, es la que muestra mediante inmunolocalización a nivel de microscopia electrónica que los gránulos de Balbiani (equivalentes a los GPCs en los núcleos con cromosomas politénicos) sólo tienen componentes del complejo de *splicing* transitoriamente en los lugares de transcripción, cuando la fibra pericromatiniana se está plegando para formar un gránulo. Los gránulos de Balbiani maduros situados en el nucleoplasma lejos de los sitios de transcripción carecen completamente de las proteínas o de los RNA de bajo peso molecular que intervienen en el *splicing* (Vázquez Nin y cols., 1990).

El conjunto de los resultados expuestos indican que los GPCs son un almacén intranuclear de mensajeros maduros, en su enorme mayoría sin intrones, que corresponden probablemente a los mensajeros de los genes de proteínas muy abundantes en células diferenciadas, y que una etapa de regulación postranscripcional de la expresión de estos genes se debe al control de la velocidad de exportación de los mensajeros del núcleo al citoplasma. Este tipo de regulación postranscripcional de la expresión genética es un fenómeno muy distribuido en la naturaleza, pues aparece durante el desarrollo embrionario con la maduración funcional de las células, y en el adulto permite efectos muy rápidos de variadas hormonas. Un trabajo reciente demuestra, mediante el uso de la hibridación de ácidos nucleicos *in situ* a nivel del microscopio electrónico, que los GPCs no son el único compartimento de mRNA intranuclear regulado por el estradiol. En efecto, la cantidad de mRNA asociado a las fibrillas pericromatinianas también aumenta con la supresión de la hormona y desciende inmediatamente después de su reposición (Vázquez Nin y cols., 1999).

Transporte intranuclear de las partículas que contienen mRNA

Deben considerarse varios aspectos en el estudio del desplazamiento de las fibras o de los gránulos pericromatinianos desde los sitios de transcripción hasta el poro de la envoltura nuclear. Uno de estos aspectos tiene que ver con los posibles trayectos entre ambos puntos y los otros con los mecanismos físico-químicos del movimiento.

Los trayectos posibles varían mucho con la posición en el espacio nuclear de la zona de transcripción, así como con la configuración general de las estructuras nucleares. La cromatina compacta que constituye un espacio densamente ocupado por complejos macromoleculares se asocia en gran medida a la envoltura nuclear en la mayoría de los núcleos. Sin embargo, frente a los poros existen canales carentes de cromatina compacta en los que el desplazamiento de estructuras supramoleculares es mucho más fácil. Las zonas transcripcionales están situadas en el borde de la cromatina compacta o en la región intercromatiniana, de manera que el movimiento de las partículas que contienen los mRNAs se puede llevar a cabo en un primer tiempo, en forma de dispersión en el mencionado espacio, y luego a lo largo de los canales que desembocan en el poro. Otra posibilidad es que las partículas se transporten vectorialmente hacia los canales y, luego, dentro de ellos hasta el poro. Las consideraciones que tienen en cuenta si los cuerpos de cromatina compacta pertenecen a territorios ocupados por un cromosoma y proponen canales intercromosomales (Daneholt, 1999) parecen menos importantes en la definición de un trayecto. De hecho, los poros nucleares no necesariamente se distribuyen en la periferia de los territorios cromosomales (López Velázquez y cols., 1996) y existen muchos más espacios entre los grumos de cromatina compacta que los espacios que pudieran quedar entre los cromosomas del juego diploide de cualquier mamífero.

Algunos experimentos realizados empleando hibridación *in situ* fluorescente sugirieron la posibilidad de que los mRNAs fueran transportados desde los sitios de la transcripción hasta la periferia del núcleo, a lo largo de caminos definidos (Huang y Spector, 1991; Xing y cols., 1993; Xing y cols., 1995). El estudio del movimiento intranuclear de sondas de RNA hibridado con oligo (dT) fluorescente en mioblastos, demostró que la velocidad de dicho movimiento corresponde con la debida a la difusión simple y que no es afectada por la privación de ATP (Politz y cols., 1998). Con métodos similares que involucran la activación de la fluorescencia en regiones seleccionadas del núcleo mediante un rayo láser, se llegaron a las mismas conclusiones (Politz y cols., 1999). En núcleos de glándulas salivales de larvas de *Chironomus tentans* se observó la migración intranuclear de los gránulos que contienen mRNA que se originan en el anillo de Balbiani, marcados con bromo uridina trifosfato, empleando el microscopio electrónico. En estos núcleos el espacio intercromatiniano es abundante y se comprobó una difusión isotrópica con gránulos que llegan rápidamente a todas las regiones del núcleo a velocidades compatibles con la difusión libre, tal vez un tanto retardada (Singh y cols., 1999).

El conjunto de los datos disponibles no descarta la posibilidad de que las partículas que contienen el mRNA se asocien transitoriamente a la matriz nuclear o a otras estructuras durante la difusión (Daneholt, 1999).

Trabajos recientes indican que las proteínas también son transportadas dentro del núcleo por difusión simple (Pederson, 2000b).

Gránulos intercromatinianos (GIC)

Estas estructuras fueron descritas por primera vez por Swift (1959) como gránulos agrupados en cúmulos en la región intercromatiniana. Monneron y Bernhard (1969) los describieron como gránulos de 20 a 25 nm de diámetro, polimorfos, a veces continuos con fibrillas (figura 12-24). El uso del contraste preferencial para ribonucleoproteínas y de hidrólisis enzimáticas y químicas del RNA demostró que los GICs están compuestos de RNA y proteínas (Monneron y Bernhard, 1969). Cuando se comprobó que los cúmulos de GIC incorporan muy poca uridina marcada con tritio en tiempos cortos y medios, se dedujo que el RNA de estos gránulos es de larga vida media (Fakan y Bernhard, 1971). Los RNAs de bajo peso molecular ricos en uridina (RNAbpmU) son los de vida media más larga y constituyeron los mejores candidatos para explicar la falta de incorporación del precursor, en experimentos relativamente breves con respecto al tiempo generacional de las células. Para poner a prueba esta hipótesis se buscó por medio de inmunolocalización si las proteínas que se unen a dichos RNAs están presentes en los cúmulos de GIC. Los resultados fueron positivos (Fakan y cols., 1984; Puvion y cols., 1984). Posteriormente se logró inmunolocalizar en los cúmulos de GIC la caperuza de guanosina trimetilada de los RNAbpmU. Cuando la hibridación *in situ* se pudo realizar a nivel de microscopia electrónica se comprobó nuevamente la presencia de

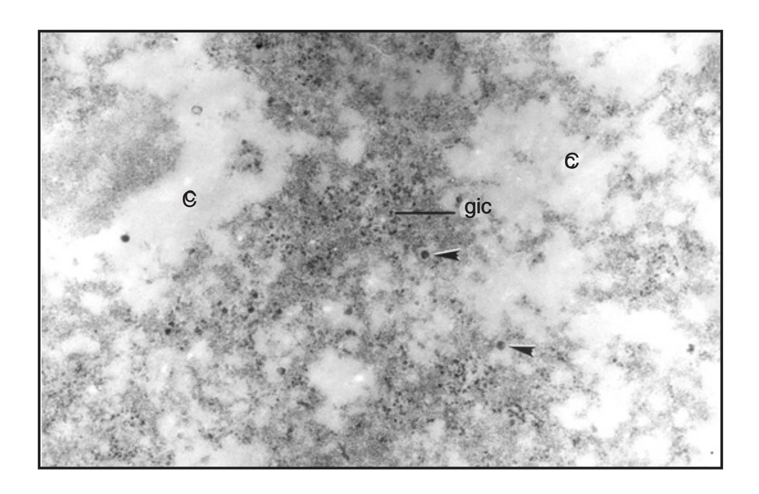


Figura 12-24. Núcleo de hepatocito de rata teñido con un procedimiento que oscurece preferencialmente las partículas ribonucleoproteicas. La cromatina compacta (c) se ve como zonas claras; se puede apreciar las formas variables de los GIC y su tamaño menor que los GPC marcados por las cabezas de flechas.

RNAbpmU en los cúmulos de GIC (Visa y cols., 1993a). Como estos RNAs están relacionados con el procesamiento postranscripcional de los pre-mRNA y los GICs no contienen RNA de marcado rápido, ni proteínas que se asocian a los RNA pre-mensajeros o mensajeros (Fakan y cols., 1984), se concluyó que los cúmulos de GIC son almacenes de la maquinaria del *splicing* que carecen del sustrato de dicho proceso, los RNA pre-mensajeros. Un dato que no concuerda con este punto de vista es el hallazgo de poli A en los cúmulos de GIC realizado usando hibridación *in situ* de alta resolución con biotinilado (Visa y cols., 1993b).

Los cúmulos de GIC son almacenes de la maquinaria del *splicing*.

Los GICs existen en plantas, animales y hongos y son muy abundantes en las células de vertebrados, en las que se agrupan en grandes cúmulos. En céfalocordados, invertebrados, plantas y hongos no se han encontrado en tal abundancia (Jiménez-García y cols., 1989).

La técnica de contraste preferencial para los GICs con oxinitrato de bismuto (Brown y Locke, 1978) favorece su localización en las células en las que estos gránulos son poco abundantes y están esparcidos en el nucleoplasma sin formar grupos. En esta forma, Medina y cols. (1989) pudieron estudiarlos en la cebolla corroborando que tienen la misma talla, forma y propiedades citoquímicas que las descritas por Monneron y Bernhard (1969) en células de mamíferos.

Cuerpos espiralados

Estas estructuras fueron descritas por Monneron y Bernhard (1969) como agregados esféricos de 0.3 a 0.5 µm de diámetro, contrastados por el procedimiento del acetato de uranilo, EDTA y citrato de plomo de Bernhard (1969), preferencial para estructuras que contienen RNA. Estos cuerpos están formados por fibras de 40 a 60 nm de espesor y están situados en la región intercromatiniana (figura 12-25), sin relación aparente con el nucleolo (Monneron y Bernhard, 1969). Los cuerpos espiralados desaparecen durante la mitosis y se forman en G1 después del reinicio de la transcripción (Lamond y Earnshaw, 1998).

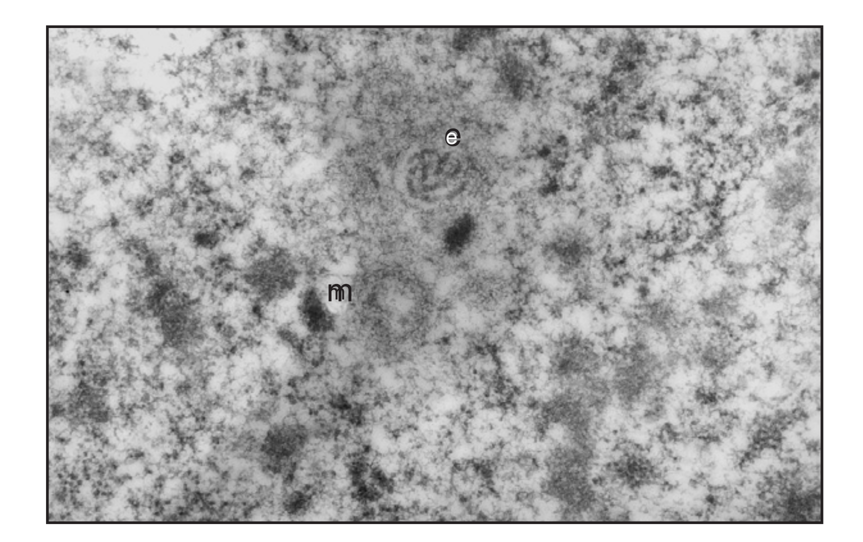


Figura 12-25. Célula de un carcinoma papilar de tiroides humana. El cuerpo espiralado e está delimitado por fibrillas muy delgadas y presenta en su interior fibras relativamente gruesas que siguen trayectos curvos. El cuerpo nuclear (m) está formado por una región de fibrillas muy finas que dejan un centro poco denso.

Santiago Ramón y Cajal en 1903 describió el cuerpo accesorio en neuronas, que fue reconocido por Hardin con el microscopio electrónico y llamado cuerpo paranucleolar, pues parecía desprenderse del nucleolo (Raška y cols., 1990). La relación entre el ahora llamado cuerpo espiralado (*coiled body*) y el nucleolo es muy variable, pues puede estar dentro del nucleolo o asociado a él como en neuronas (Raška y cols., 1990) y en células de animales en hibernación (Malatesta y cols., 1994a y b) o no estarlo, como en hepatocitos de animales que no hibernan o en el periodo eutérmico de los hibernantes (Monneron y Bernhard, 1969; Malatesta y cols., 1994a) o en células en ciclo mitótico (Raška y cols., 1990). La composición de estos cuerpos es sorprendente, pues en ellos se han encontrado tanto componentes relacionados con el procesamiento de los RNAs premensajeros, como proteínas nucleolares. Entre los primeros están los RNAbpmU (U1, U2, U4, U5 y U6) y sus proteínas asociadas (Carmo-Fonseca y cols. 1991a y 1991b) y también U3, U7 y fibrilarina (Ochs y cols., 1994; Lamond y Earnshaw, 1998). Sin embargo, los cuerpos espiralados no contienen otros componentes como pre-mRNA, RNA 5S, ni otros rRNAs. Una proteína de 80 kDa llamada p80-coilina es considerada característica de los cuerpos espiralados, aunque en células HeLa ha sido encontrada, además, en una zona asociada a los gránulos intercromatinianos (Puvion-Dutilleul y cols., 1995).

> Una proteína de 80 kDa llamada p80-coilina es considerada característica de los cuerpos espiralados.

Como el tamaño de los cuerpos espiralados está en el límite de la resolución del microscopio óptico, los principales hallazgos sobre su composición se han realizado empleando la hibridación *in situ* y la inmunolocalización a nivel del microscopio electrónico, aunque también la inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra la proteína p80-coilina ha aportado importantes datos sobre su número, localización y movilidad dentro del núcleo.

Los cuerpos espiralados han sido encontrados en plantas (Moreno Díaz de la Espina y cols., 1982; Jiménez-García y cols., 1992), demostrándose que son estructuras muy antiguas y conservadas por la evolución.

La autorradiografía ultraestructural demostró que los cuerpos espiralados no contienen RNA recientemente sintetizado en animales (Fakan y Bernhard, 1971), ni en plantas (Moreno Díaz de la Espina y cols., 1982), lo que corrobora la falta de los rRNA y pre-mRNA, posibles sustratos de la maquinaria del procesamiento postranscripcional parcialmente contenida en dichos cuerpos. Esos hallazgos también sugieren una unidad de composición y muy probablemente de función de esos cuerpos, en eucariontes taxonómica y evolutivamente muy separados.

Cuerpos nucleares

Son estructuras esferoides de 0.5 a 2 μm de diámetro compuestas por fibrillas, gránulos o glóbulos, han sido descritos en células normales y patológicas, aunque son mucho más frecuentes en estas últimas. La mayoría de los estudios se han realizado en humanos u otros mamíferos con diversas enfermedades, principalmente neoplásicas o virales, donde se ha podido sistematizar varios tipos de cuerpos nucleares tomando en cuenta su tamaño y sus características morfológicas (Bouteille y cols., 1967; Krishan y cols., 1967; Poppof y Stewart, 1968). Generalmente, están formados por fibrillas dispuestas en forma circular concéntrica, por fibrillas en remolinos o por fibrillas periféricas y gránulos o glóbulos densos centrales (figura 12-25). Algunos tratamientos hormonales inducen la formación de cuerpos nucleares. La administración hormona adrenocorticotrófica produce la aparición de numerosos cuerpos nucleares en la región fasciculada de la corteza suprarrenal de becerros (Weber y cols., 1964), pero no en la de ratas hipofisectomizadas (Vázquez Nin y cols., 1997b). El estradiol tiene un efecto similar sobre el hígado de gallo (Brasch y cols., 1989; Ochs y cols., 1995). Dado lo puntual de esas observaciones es difícil interpretar esos efectos como propiedades generales de las acciones hormonales. Sin embargo, el tratamiento del hígado de gallo con estradiol ha permitido aislar una fracción nuclear rica en cuerpos nucleares y analizarla con métodos bioquímicos. El resultado de dicho análisis mostró que esos cuerpos están compuestos por numerosas proteínas, algunas probablemente propias de ellos. Los ácidos nucleicos sólo están presentes en forma de trazas (Brasch y cols., 1989). Cabe señalar que algunos autores incluyen a los cuerpos espiralados entre los cuerpos nucleares (Ochs y cols., 1995), mientras que otros incluyen además a cuerpos rodeados de una o dos membranas (Brasch y cols., 1989; Brasch y Ochs, 1992). Las fibrillas y los gránulos que componen varios de los tipos de cuerpos nucleares es muy probable que contengan RNA, pues son contrastadas con el procedimiento del EDTA, que tiñe preferencialmente las RNPs (González-Oliver y cols., 1997).

En plantas, se han descrito cuerpos nucleares compuestos por fibrillas inmersas en una sustancia amorfa. Tratamientos con proteasa y ribonucleasa demuestran la naturaleza RNP de estos cuerpos (Luck y Lafontaine, 1982).

El papel funcional de estos cuerpos es desconocido, se sugiere una posible relación con los estados de hiperactividad celular (Bouteille y cols.,

1967), que es concordante con el aumento del número de los cuerpos nucleares durante la estimulación por hormonas.

Otras estructuras que pueden incluirse entre los cuerpos nucleares son las llamadas estructuras parecidas a anillos (*ring-like structures*) descritas por Brasch y Ochs (1992), los anillos compactos de Puvion-Dutilleul y Puvion (1991), las estructuras en forma de anillos (*ring-shaped structures*) encontradas por Jiménez-García y cols. (1992) y los cuerpos densos redondos vistos por Kopecny y cols. (1996). Los diferentes cuerpos anulares están formados por una capa externa que toma intensamente el contraste habitual en microscopia electrónica, otorgado por el acetato de uranilo y citrato de plomo, y un centro que se tiñe mucho más claro con esas sales (figura 12-26). Las estructuras en forma de anillo pueden ser muy escasas en células normales como los hepatocitos, y hacerse frecuentes por efecto de la administración de una hormona como el estradiol (Brasch y Ochs, 1992), o formarse por una invasión viral (Puvion-Dutilleul y Puvion, 1991). También pueden ser abundantes en algunos tipos de células normales como en los blastómeros de embriones de cerdo, antes de la implantación (Kopecny y cols., 1996), y en células parenquimatosas de una planta monocotiledónea, *Lacandonia schismatica* (Jiménez-García y cols., 1992), lo que demuestra una importante conservación a lo largo de la evolución de los eucariontes. La región interna de estas estructuras se tiñe con el procedimiento del EDTA preferencial

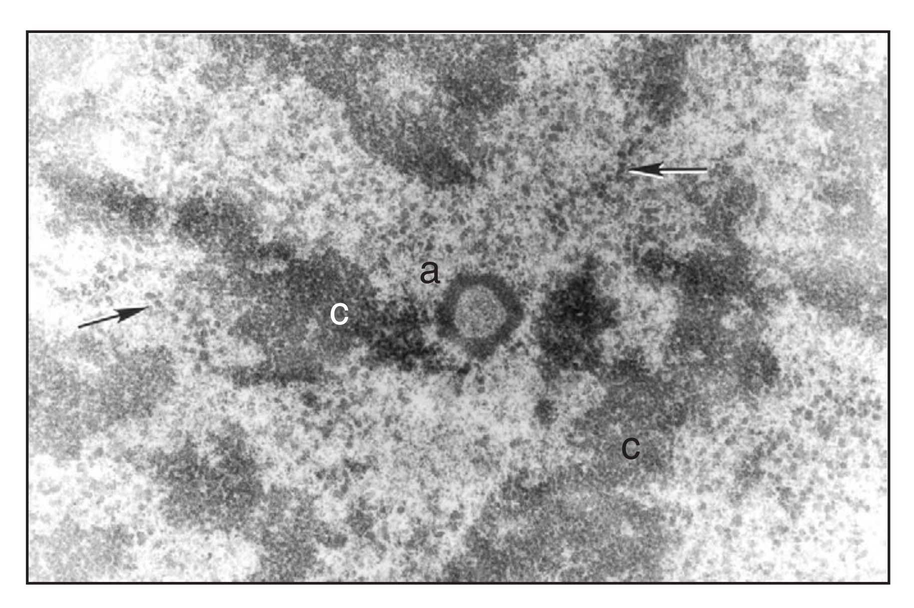


Figura 12-26. a) Célula parenquimatosa de *Lacandonia schismatica* (monocotiledónea) contrastada con acetato de uranilo y citrato de plomo de manera de visualizar todas las estructuras. El cuerpo anular (a) presenta su capa externa densamente teñida mientras que la región central, que es finamente fibrilar, aparece más clara. La cromatina compacta (c) tiene una disposición reticular, observada también recientemente con microscopía de fuerza atómica (b). Los gránulos marcados por las flechas tienen una distribución nucleoplásmica y una talla intermedia entre los GICs y los GPCs. Se piensa que pudieran corresponder a los gránulos de Balbiani de los dípteros.

para RNP, indicando la presencia de RNA en esa zona, mientras que la parte anular externa aparece clara con ese método, pero se marca intensamente con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas que se asocian a los RNAs de bajo peso molecular ricos en uridina que intervienen en el *splicing* del pre-mensajero (Agredano-Moreno y cols., 1994; Kopecny y cols., 1996). Las estructuras en forma de anillo carecen de DNA, pero pueden ser contiguas a fibras de cromatina laxa. Su papel citofisiológico es desconocido.

En las células de los pacientes con leucemia promielocítica aguda se encontró una nueva proteína que se llamó PML. Esta proteína se localizó en pequeños cuerpos nucleares en células normales y distribuida en el nucleoplasma en las células neoplásicas (Weis y cols., 1994; Koken y cols., 1994). El ácido retinoico que se emplea en el tratamiento de esta enfermedad induce nuevamente la localización de la proteína PML en los cuerpos nucleares (Weis y cols., 1994). La inmunolocalización de la proteína a nivel del microscopio electrónico mostró que los llamados cuerpos PML son estructuras esféricas de 0.3 a 1 micra de diámetro constituidas por una cápsula fibrilar externa que aparece densa con las técnicas de contraste comunes y reacciona con el anticuerpo, mientras que su parte interna es finamente fibrilar o tubular (Koken y cols., 1994). Utilizando a la proteína PML como marcador de estos cuerpos nucleares, se ha demostrado que contienen varias otras proteínas como Sp100, Sp140BLM, entre otras (Zhong y cols., 2000). Sin embargo, no contienen snRNPs, ni otros factores de *splicing* (Lamond y Earnshaw, 1998). Estos cuerpos están fuertemente asociados a la matriz nuclear y pueden ser de composición heterogénea (Zong y cols., 2000). La presencia de algunas proteínas virales en los cuerpos PML, así como las alteraciones que sufren durante varias infecciones virales sugirió que pueden desempeñar una función en la defensa contra esos agentes infecciosos (Lamond y Earnshaw, 1998). Por otra parte, los estudios de inactivación y de sobreexpresión del gen PML en el ratón indican que esta proteína, así como también los cuerpos PML, están involucrados en varias funciones a través de la regulación de la transcripción de diversos genes (Zhong y cols. 2000).

Matriz nuclear

La matriz nuclear fue descrita originalmente hace más de medio siglo en la ex URSS, como la estructura que queda después de la extracción de núcleos con altas concentraciones de sales (Zbarskii y Debov, 1948, citados por Pederson, 2000a; más antecedentes en la revisión de Pederson, 1998). El nombre de matriz nuclear fue acuñado por Berezney y Coffey (1974) en un trabajo sobre una “fracción residual de proteínas nucleares” como la habían llamado previamente Smetana y cols. (1963, citados por Pederson, 2000a). El hallazgo de Berezney y Coffey tuvo gran repercusión y fue seguido por numerosos trabajos que intentaron profundizar el conocimiento de esta estructura tanto en lo referente a su morfología, como a su composición y funciones (Berezney, 1984; Verheijen y cols., 1986). En

muchos de estos trabajos se hicieron cambios en el procedimiento de preparación y se usaron, además de las extracciones mencionadas: DNAasa, soluciones salinas de baja fuerza iónica, RNAasa, con o sin compuestos que estabilicen los disulfuros y en diferentes secuencias (ver las revisiones mencionadas).

La matriz nuclear está compuesta de tres elementos.

Todos los autores concuerdan en que la matriz nuclear está compuesta de tres elementos: uno periférico formado por el conjunto de lámina-complejos de poro, los restos nucleolares y una serie de estructuras fibro-granulares que ocupan buena parte del volumen nuclear muchas veces llamados red interna o matriz interna (figura 12-27). La matriz después de las extracciones mantiene la forma general del núcleo del cual proviene y aproximadamente su tamaño. Sin embargo, no existe tal acuerdo en cuanto a su composición, pues los diferentes procedimientos de preparación de las matrices producen variadas composiciones. Aunque es muy frecuente encontrar en ellas proteínas que se asocian al RNA, en especial al mensajero o pre-mensajero (figura 12-28). La poca constancia en su composición hace que la matriz nuclear tenga una definición operacional que no puede incluir características bioquímicas o funcionales. La lámina tiene una composición y funciones que se han aclarado recientemente, pero la noción de red interna se ha cuestionado, sugiriendo que no es una estructura natural sino un artefacto de agregación, coagulación y formación de uniones disulfuro al azar (Brasch, 1990). Otros artefactos se producen durante la aislación de una fracción nuclear que precede generalmente a las extracciones (Pederson, 2000a).

Los tres componentes estructurales de la matriz nuclear se han encontrado en protistas (Mínguez y cols., 1994), en levaduras y plantas (Moreno Díaz de la Espina y cols., 1991) y en animales (Driel y cols., 1991).

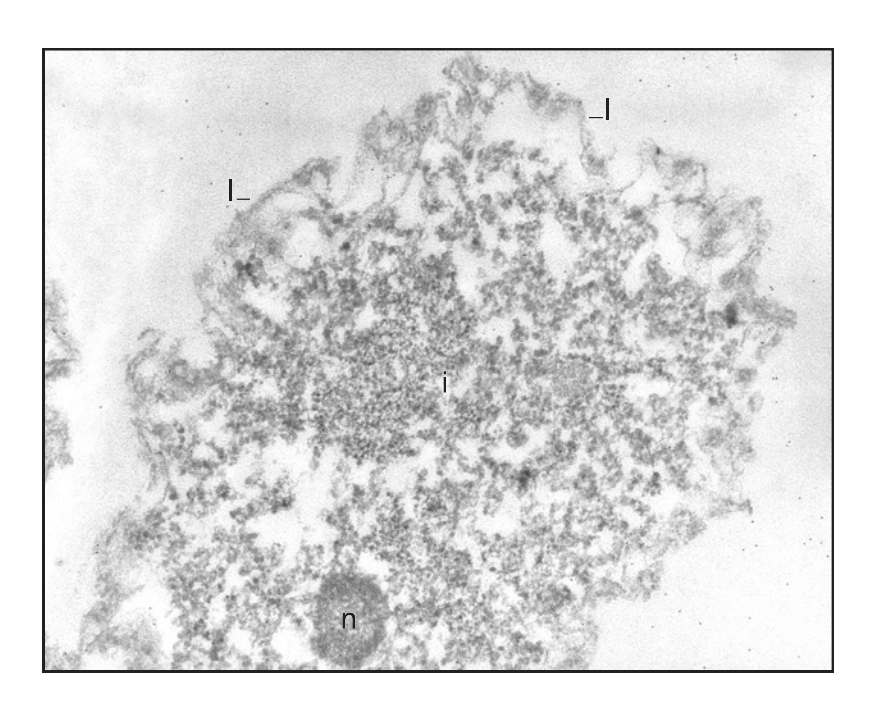


Figura 12-27. Matriz final de hepatocito mostrando la lámina (l), la matriz interna conteniendo los restos de un gran cúmulo de gránulos intercromatinianos (i) y los restos de un nucleolo (n).

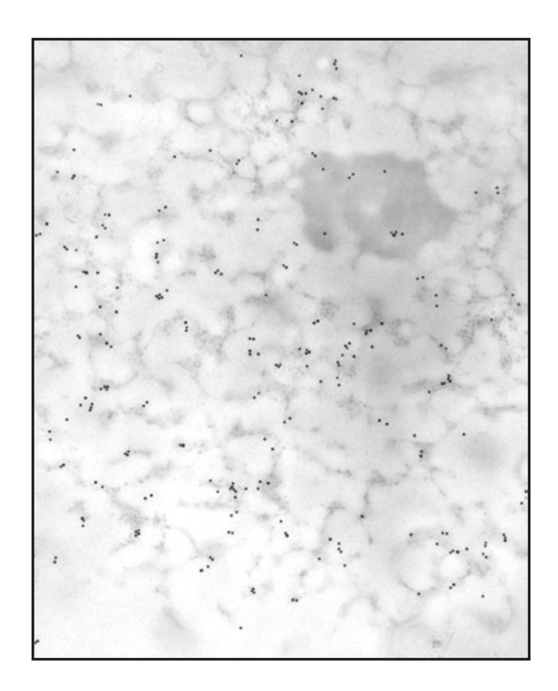


Figura 12-28. Matriz de hepatocito criofijada y crioprocesada. Se ha inmunolocalizado una proteína asociada al RNA mensajero o pre-mensajero, cuya amplia distribución está señalada por los granos de oro.

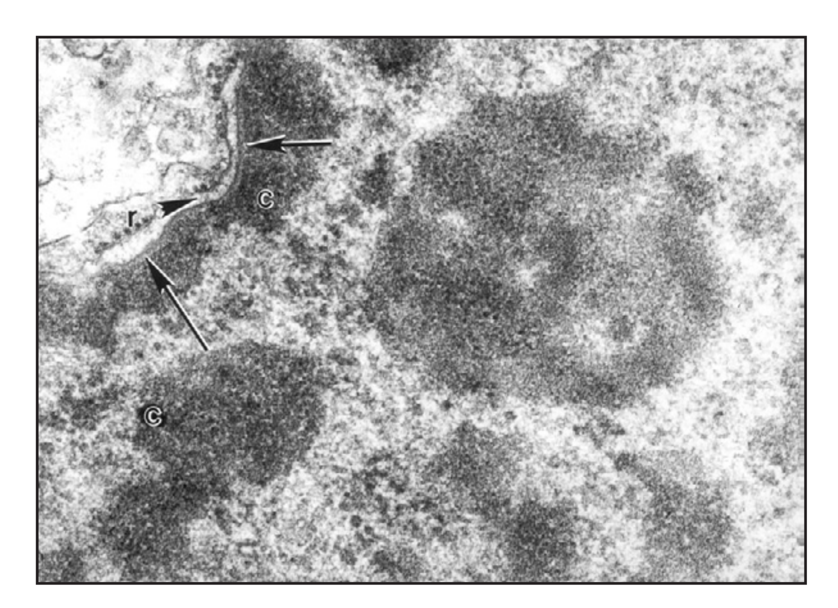


Figura 12-29. Micrografía electrónica de gran aumento de núcleos de hígado de rata. La lámina nuclear (flechas) se aprecia como una delgada zona menos teñida situada entre la cromatina compacta (c) y la membrana interna de la envoltura nuclear. En la luz de la envoltura nuclear o cisterna perinuclear se ven algunos delgados filamentos (cabeza de flecha) que parecen originarse en los ribosomas (r) adheridos a la membrana externa.

La lámina

Del conjunto de lámina y complejo de poro veremos acá únicamente la lámina, pues el poro será descrito en relación con la envoltura nuclear. La lámina es una capa proteica de 10 a 20 nm de espesor, adosada a la cara interna de la membrana nuclear en forma continua, salvo las interrupciones en el borde de los poros (figuras 12-27 y 12-29). Está formada por un número variable de proteínas —llamadas laminas, sin acento escrito [la-mí-nas]— según el grupo taxonómico, por ejemplo, existen tres en mamíferos (A, B y C),

La lámina es una capa proteica de 10 a 20 nm de espesor, adosada a la cara interna de la membrana nuclear.

dos en aves, cuatro en anfibios (Brasch, 1990). Estas proteínas son similares a los filamentos intermedios, tienen entre 65 y 75 kDa de peso molecular, una larga región cilíndrica (hélice α), dos regiones globulares en el extremo carboxilo y señal de localización nuclear. Se agrupan en forma de una red de filamentos entrecruzados para formar la lámina (Fuchs y Weber, 1994). En células indiferenciadas o carcinomatosas de mamífero, puede faltar la lamina A. Durante la diferenciación de los mioblastos en fibras musculares, la expresión de la lamina A comienza inmediatamente antes que la de varias de las proteínas del estado diferenciado del músculo. La lamina A se solubiliza durante la mitosis, mientras que la B se distribuye en el citoplasma asociada a la membrana de vesículas derivadas de la fragmentación de la envoltura nuclear. La función de las laminas parece ser la de anclar la cromatina a la envoltura nuclear (Brasch, 1990).

Los filamentos intermedios filogenéticamente más antiguos son los de la lamina nuclear. En algunos protistas no se han encontrado filamentos intermediarios citoplasmáticos, pero sí laminas. La lamina nuclear parece desempeñar una función indispensable para la vida de los eucariontes, mientras que los filamentos intermediarios citoplasmáticos no, pues algunas células de vertebrados carecen de filamentos intermediarios, pero ninguna de laminas. Los filamentos intermedios citoplasmáticos posiblemente hayan derivado de laminas durante la evolución. En este sentido, es interesante señalar que en algunos grupos de invertebrados hay mayor similitud entre las proteínas de los filamentos intermediarios citoplasmáticos y las laminas, que en los vertebrados.

Algunas laminas han sido encontradas en el espacio intercromatiniano y en el borde de la cromatina compacta en células tiroideas normales (Echeverría y cols., 1998). Recientemente, se ha encontrado lamina A en los grumos que contienen componentes del *splicing*, es decir, en los cúmulos de granos intercromatinianos, empleando inmunolocalización fluorescente (Jagatheesan y cols., 1999). Como estos cúmulos están muy relacionados con la matriz nuclear, es posible que estas proteínas sean también componentes de la matriz nuclear interna.

Matriz nuclear interna

La composición molecular de la red interna es variable conforme al método de preparación. Sin embargo, la matriz interna generalmente contiene proteínas que se unen al RNA mensajero y pre-mensajero, así como a los RNAs de bajo peso molecular ricos en uridina y también restos de dichos RNAs. Estas proteínas se han inmunolocalizado fácilmente en las matrices producidas por métodos convencionales. También aparecen en las matrices internas de varios tipos de eucariontes la enzima topoisomerasa II, que cataliza cambios de conformación del DNA, así como una proteína de 95 kDa que reconoce secuencias de bases específicas en el DNA, llamadas secuencias MARs. Los escasos restos de DNA que quedan asociados a la matriz interna después de extracciones por soluciones de diferente fuerza iónica y DNAasas, están muy enriquecidos en estas secuencias, por lo que se las llama regiones de unión a la matriz (*matrix*

attachment regions, en inglés). Las funciones nucleares que han sido localizadas en la matriz interna, al menos parcialmente, son: la duplicación del DNA, la transcripción no nucleolar y el procesamiento postranscripcional del pre-mRNA (Driel y cols., 1991). En efecto, en algunos experimentos de aislamiento de matrices se han encontrado diversos componentes fundamentales del funcionamiento nuclear asociados a la fracción insoluble. Éstos son: a) la DNA polimerasa y los DNAs nacientes relacionados con la replicación; b) la RNA polimerasa II, factores proteicos de la transcripción y reguladores de esa función, como los receptores de esteroides, y c) proteínas y RNAbpmU relacionados con el *splicing* (Driel y cols., 1991).

La falta de concordancia de los diversos trabajos sobre la composición de la matriz interna hace que los datos que sugieren más claramente su existencia sean los morfológicos. La distribución de diversas estructuras y funciones nucleares en regiones bien definidas o compartimentos subnucleares, indica la presencia de una estructura que mantenga juntos los elementos que componen un compartimento y a la vez separados de los elementos de otro. En efecto, las investigaciones que emplean inmunolocalizaciones fluorescentes y ultraestructurales demuestran que la actividad de replicación, de transcripción y de *splicing* no están distribuidas en forma homogénea, sino que están en algunos sitios bien definidos. También se han podido distinguir lugares de almacenamiento de los componentes del *splicing* —en forma de cúmulos de GIC— y las reservas RNA mensajeros maduros en los GPCs. Ninguno de estos elementos se distribuyen al azar, sino en regiones bien definidas, fuera de las cuales no se encuentran las sustancias que los forman. De hecho, en muchos casos estas funciones, componentes y estructuras, como los cúmulos de GIC, se pueden encontrar asociados a las matrices nucleares. La distribución de los componentes nucleares en compartimentos bien definidos se evidencia también en que la posición del nucleolo es estadísticamente constante en dos o tres lugares, de todos los posibles dentro del núcleo, en el mismo tipo celular, en el mismo estado citofisiológico (Vázquez Nin y cols., 1983). Si bien es cierto que la no dispersión de los componentes nucleolares en el nucleoplasma se deba a las propiedades de la matriz nucleolar, no es menos cierto que la posición del nucleolo dentro del espacio nuclear debe depender de una organización de distribución tridimensional de compartimentos que abarque el conjunto del espacio nuclear. Entre las estructuras intranucleares conocidas, la matriz interna es el mejor candidato para explicar los fenómenos de distribución tridimensional de las estructuras y funciones nucleares en forma no homogénea, sino ocupando regiones diferentes dentro del espacio intercromatiniano. Por otro lado, existen numerosas observaciones con el microscopio electrónico de redes filamentosas y granulares correspondientes a la matriz interna realizadas sobre preparaciones de botones de centrifugación de matrices obtenidas por los procedimientos clásicos, tanto en núcleos de células animales, vegetales (Moreno Díaz de la Espina, 1995) o de otros eucariontes. Sin embargo, estas redes internas aparecen formadas por filamentos tan gruesos que no podrían pasar inadvertidos en las observaciones de cortes de núcleos, en las que nadie las ha puesto de manifiesto. El estudio de dicha red interna fibro-

granular en cortes contrastados con técnicas de rutina o con procedimientos citoquímicos para ácidos nucleicos, resulta muy difícil por la gran cantidad de estructuras fibrilares y granulares que existen en el espacio intercromatiniano, que es además el sitio de gran parte de la cromatina laxa, de parte de la transcripción y el *splicing*, así como también es un lugar de tránsito de los complejos RNP sintetizados en la región pericromatiniana. El uso de drogas que alteran la transcripción y/o la síntesis proteica como la α-amanitina y la actinomicina D, han permitido observar núcleos con el espacio intercromatiniano parcialmente desprovisto de sus componentes habituales. En esas circunstancias, se ha podido poner de manifiesto, con microscopia electrónica clásica, redes de finísimos filamentos que pueden ser la base estructural de la matriz interna (Brasch, 1990). Sin embargo, se desconoce completamente la composición de dicha red. Tal vez la mejor demostración de la existencia de una red de filamentos extremadamente delgados carentes de ácidos nucleicos, que se relacionan con la matriz interna, se ha obtenido en trabajos en los que se ha empleado la microscopia electrónica de transmisión con filtro de energía de electrones para estudiar el núcleo con cromosomas politénicos de las glándulas salivales de dípteros en estado larvario (Vázquez-Nin y cols., 1997a). Estos núcleos tienen todos los sitios de transcripción en las regiones eucromáticas de los cromosomas interfásicos y la mayor parte del *splicing* se realiza en los sitios de transcripción, por lo que el resto del espacio nuclear es simplemente un lugar de tránsito de los complejos RNP hacia los poros de la envoltura nuclear y la densidad de estructuras es mucho menor que en la región intercromatiniana de los núcleos no politénicos (Vázquez Nin y cols., 1990; Vázquez Nin y Echeverría, 1996). Estas características permiten que con el microscopio electrónico con filtro de energía se diferencien los filamentos que son puramente proteicos de los que contienen además ácidos nucleicos. De esta forma se pudo individualizar un retículo de filamentos proteicos que se mezclan con otros morfológicamente similares pero de naturaleza RNP. Esta red ocupa toda la región extracromosómica, y se une a la lámina que recubre la envoltura nuclear, a las partículas RNP granulares y a la cromatina compacta (Vázquez Nin y cols., 1997a).

El nucleolo

El nucleolo es el sitio de síntesis y procesamiento del pre-rRNA y del ensamblado de las subunidades del ribosoma.

El nucleolo es el sitio de síntesis y procesamiento del pre-rRNA y del ensamblado de las subunidades del ribosoma. Ultraestructuralmente consta de centros fibrilares, componente fibrilar denso y componente granular. Está constituido por los genes rDNA, proteínas, rRNA y sus precursores y diferentes UsnoRNA. Durante la mitosis el nucleolo se disgrega y se reorganiza en telofase alrededor de las regiones organizadoras del nucleolo (NOR).

En el ser humano, los genes ribosomales están localizados en los cromosomas acrocéntricos y se calcula que hay alrededor de 200 copias. En otras especies como anfibios y helechos o gimnospermas, los genes ribosomales ocurren en el orden de miles. Los productos de la expresión de esos genes, que son repetidos, arreglados en tándem y muy activos, se da en

forma de una molécula precursora conocida como pre-rRNA. Ésta madura a través de cortes, metilaciones y pseudouridinaciones para dar lugar a los rRNA 18S, 5.8S y 28S, que forman parte del ribosoma.

Restos nucleolares

La composición de los restos nucleolares se ha estudiado en nucleolos aislados mediante la extracción con DNAasa I en un primer tiempo, seguida de un lavado en NaCl 2M. La fracción insoluble ha perdido el DNA, los RNAs de bajo peso molecular ricos en uridina, 95% del RNA ribosomal y pre-ribosomal, así como la mayoría de las histonas, de la proteína C23, de las proteínas ribosomales y de las sustancias de bajo peso molecular. Las matrices nucleolares están enriquecidas en proteínas de 34 y 57 kDa, laminas A y C, proteínas no identificadas de alto peso molecular, porciones del DNA del espaciador situado entre las unidades transcripcionales y otros componentes menos abundantes, como proteínas muy ácidas, que no obstante se unen a DNA (Shiomi y cols., 1986). Es interesante señalar la presencia de laminas en los residuos nucleolares. Este hallazgo puede ser debido a una frecuente relación entre la envoltura nuclear y el nucleolo o a una localización de las laminas hasta ahora desconocida.



Envoltura nuclear

La envoltura del núcleo es una cisterna similar, aunque no igual, a las del retículo endoplásmico. Está formada por dos membranas, una externa y una interna constituidas como todas las membranas biológicas por dobles capas de fosfolípidos y proteínas. La membrana interna tiene algunas proteínas que no existen en otras membranas. En la membrana externa se pueden adherir ribosomas que sintetizan proteínas no citosólicas, entre ellas, proteínas de secreción (figura 12-29). La envoltura nuclear ha sido llamada cisterna perinuclear y es a menudo continua con cisternas comunes del retículo endoplásmico rugoso, como se puede observar en células animales tanto como en células vegetales. Estas continuidades se realizan a través de la membrana externa, la interna nunca participa en ellas. Otra particularidad de la cisterna perinuclear es la de estar perforada por poros que permiten el tránsito de moléculas entre el citosol y el nucleoplasma.

> La envoltura del núcleo está formada por dos membranas, una externa y una interna.

Complejos de poro

Son estructuras supramoleculares, con una simetría rotacional octogonal, de unos 125 nm de diámetro y un peso de aproximadamente 120 megadaltones (MDa). Están situados en lugares donde la membrana interna y la externa de la envoltura se fusionan limitando un agujero circular. El complejo de poro ocupa dicho orificio e impide el libre flujo a través de él (figuras 12-14b y 12-30). Su estructura tridimensional ha sido estudiada principal-

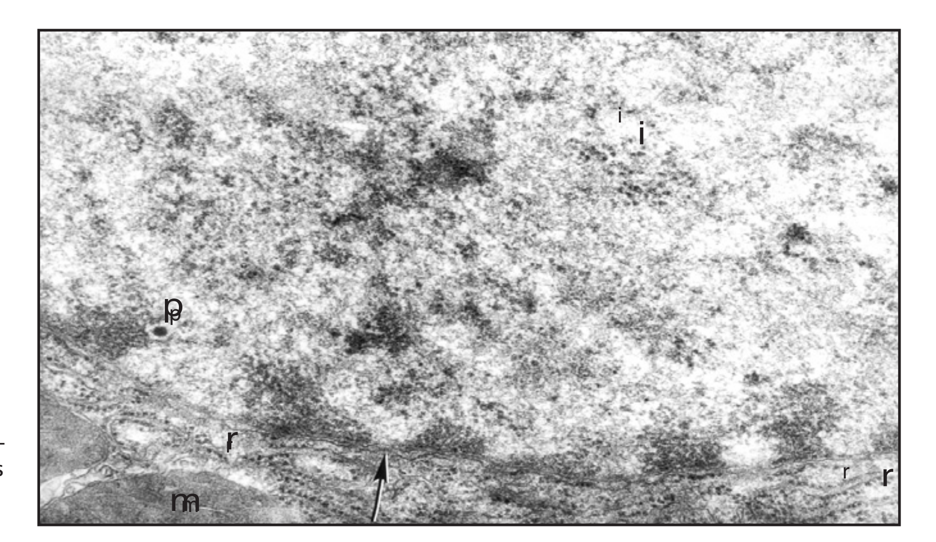


Figura 12-30. Núcleo de hepatocito de rata. La flecha señala uno de los complejos de poro. (p) Gránulo pericromatiniano. (i) Gránulos intercromatinianos. (r) Ribosomas adheridos a cisternas del retículo endoplásmico rugoso. (m) Mitocondrias.

mente con el microscopio electrónico en cortes teñidos con sales de metales pesados en la forma habitual (contraste positivo), o en extendidos de envolturas de núcleos gigantes como los de los ovocitos de anfibios, contrastados negativamente. El contraste negativo se logra ocupando los espacios vacíos del material biológico con una solución relativamente concentrada de un compuesto que tiene un átomo de elevado número atómico. De esta forma, en la imagen del microscopio electrónico aparecerán en claro las regiones que tienen abundantes moléculas orgánicas, en las que predominan los átomos de bajo número atómico y en oscuro las normalmente vacías. Según Panté y Aebi (1995), el complejo está formado por una estructura principal que ellos llaman el complejo de radios o rayos de rueda, el anillo citoplasmático y el anillo nuclear. Aunque todas estas estructuras tienen componentes distribuidos en forma de octógono regular, esta disposición es muy clara en la parte central constituida por una especie de rueda con 8 rayos. La parte central de la rueda está ocupada por un componente muy variable entre un poro y otro, llamado partícula central, transportador, o complejo del canal central (figura 12-31). La variabilidad de este complejo puede deberse a que en gran medida no está formado por componentes del poro, sino por material en tránsito entre uno y otro compartimento (Panté y Aebi, 1995). Por la periferia, el complejo de radios se une al borde de fusión de las membranas. Todo el complejo de poro se une por su periferia a la lámina nuclear, con la que permanece adherido después de las variadas extracciones que se realizan para obtener las matrices nucleares. El anillo citoplasmático es una estructura de unos 110 nm de diámetro, formada por 8 filamentos de una masa molecular de aproximadamente 32 MDa. Estos filamentos pueden formar puentes entre un poro y otro o estar doblados hacia el centro del poro. Esta última posición sugiere que esos filamentos estarían involucrados en poner en posición adecuada a una proteína que vaya a pasar del núcleo al citoplasma. El anillo nuclear está formado también de filamentos largos que adquieren la forma de una cestilla en el nucleoplasma.

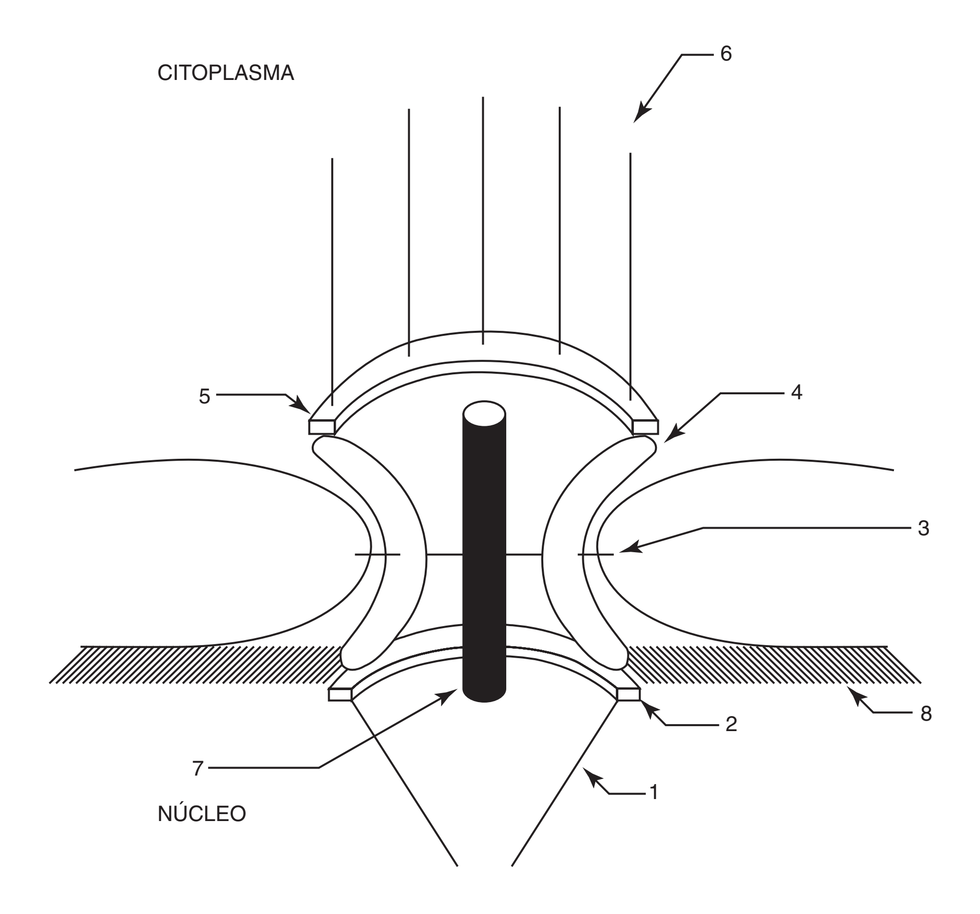


Figura 12-31. Complejo de poro nuclear esquematizado para mostrar algunos de sus componentes. (1) Cestilla de fibras nucleares. (2) Anillo nuclear. (3) Glucoproteína que atraviesa la membrana y probablemente sirva de anclaje. (4) Columnas del complejo principal de estructuras del poro. Este complejo tiene simetría octogonal e incluye las ocho fibras de la parte media (en el mismo plano que las glucoproteínas marcadas con 3), de las que se dibujan en este esquema dos en forma de diafragma. (5) Anillo citoplasmático. (6) Fibras citoplasmáticas. (7) Complejo del canal central. (8) Lámina proteica que forma parte de la matriz nuclear y que se une al complejo de poro.

El complejo de poro está formado por alrededor de 100 polipéptidos llamados nucleoporinas. De ellos, se han identificado, caracterizado y se conocen las secuencias de unos pocos, tal vez no más de 15% de la masa del complejo. Varios de los polipéptidos estudiados son glucoproteínas cuya parte glucídica se une al O de serinas o treoninas en múltiples sitios del polipéptido. Frecuentemente, está presente la acetilglucosamina, por lo que esas proteínas reaccionan con la aglutinina del germen de trigo. Esta reacción permitió localizarlas con el microscopio electrónico, marcando la aglutinina con granos de oro de unos pocos nanómetros de diámetro. Por otra parte, se han logrado realizar algunos anticuerpos que facilitaron la inmunolocalización ultraestructural de algunas nucleoporinas en los anillos citoplasmático y nuclear o en el complejo de radios.

El complejo de poro está formado por alrededor de 100 polipéptidos llamados nucleoporinas.

Permeabilidad y transporte en el poro

Estudios realizados con sustancias de diferente peso molecular marcadas indican que moléculas de 5,000 daltones o menos, inyectadas en el citoplasma, difunden libremente al interior del núcleo. Las proteínas de alrededor de 15,000 daltones demoran 2 minutos en equilibrar sus concentraciones a ambos lados de la envoltura nuclear. A medida que las moléculas proteicas son de mayor talla, demoran más en entrar al núcleo y las de 60,000 daltones prácticamente no atraviesan los poros. La velocidad de pasaje no depende tanto de la masa molecular como del tamaño de la molécula o complejo macromolecular, aunque muchas proteínas grandes son transportadas sin desplegarse y grandes complejos multimoleculares como las partículas RNP también logran transponer el poro (Talcott y Moore, 1999). Sin embargo, pruebas de fijación de voltaje demostraron que, desde el punto de vista eléctrico, los poros de la envoltura nuclear no son libremente permeables por iones y la membrana ofrece una resistencia de 30 a 100 Megaohmios (Dale y cols., 1994) y presenta grandes canales de permeabilidad selectiva para cationes (Matzke y cols., 1990). De estos trabajos se concluye que el núcleo es un compartimento eléctricamente aislado cuya envoltura separa dos compartimentos con diferente concentración de moléculas de bajo peso molecular cargadas, incluyendo iones inorgánicos (Dale y cols., 1994).

Se conoce que existen al menos dos tipos de señales de localización nuclear en las proteínas cariofílicas.

En 1970 Gurdon comprobó que la albúmina inyectada en el citoplasma de ovocitos de *Xenopus* no penetra en el núcleo, pero que las histonas sí, de lo que concluyó que la entrada de proteínas al núcleo es un proceso selectivo. Posteriores experimentos de este grupo sugirieron que las proteínas que se acumulan en el núcleo tienen una señal que les permite la entrada (Wagner y cols., 1990). En efecto, ahora se conoce que existen al menos dos tipos de señales de localización nuclear en las proteínas cariofílicas. Una consiste en una secuencia de ácidos aminados básicos —Pro, Lis, Lis, Lis, Arg, Lis, Val— y fue estudiada por primera vez en el antígeno T del virus SV40. El segundo tipo de señal fue caracterizado en la nucleoplasmina y se compone de dos grupos de ácidos aminados básicos separados por una secuencia variable de alrededor de 10 ácidos aminados. El proceso de transporte se produce en dos etapas, primero, la unión de la proteína que posee señal, al aspecto citoplasmático del complejo de poro y, segundo, la translocación de la misma al nucleoplasma. Las dos etapas requieren factores citosólicos propios de cada una. La primera puede realizarse sin gasto de energía, mientras que la segunda requiere ATP (Simos y Hurt, 1995). Se ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos de transporte de las proteínas del citoplasma al núcleo usando células cuyo núcleo está intacto, pero su citoplasma se ha permeabilizado con digitonina. En este material se puede individualizar las proteínas necesarias para restituir la capacidad de transporte perdida por la salida de componentes solubles citosólicos. Estas proteínas involucradas con el transporte se han individualizado en varios vertebrados y han recibido nombres diferentes. La señal es reconocida por una proteína citosólica llamada importina 60 o carioferina α. Esta proteína es a su vez reconocida por la impor-

tina 90 o carioferina β, que permite que el conjunto se una a secuencias repetidas de ácidos aminados de algunas nucleoporinas del lado citoplasmático del complejo de poro. En la translocación interviene una GTPasa de 27 kDa (llamada Ran) y numerosos factores de regulación de la actividad de esta enzima. Como resultado, la proteína cariofílica es transportada al nucleoplasma donde se desprende de la importina 60, que se recicla (Simos y Hurt, 1995). Los RNAs de bajo peso molecular ricos en uridina salen del núcleo al citoplasma, donde se unen a proteínas específicas y regresan al núcleo unidos a ellas. Los mecanismos de importación de estos conjuntos RNP, son desconocidos, pero diferentes a los de la importación de proteínas.

La exportación del RNA también ocurre por acarreadores y depende de energía.

La exportación del RNA también es mediada por acarreadores y depende de energía. No parece existir una señal única de salida, pues la salida de los diferentes tipos de RNAs (tRNA, mRNA, rRNA 5S, RNAbpmU) no compiten en la saturación de los sistemas de transporte. Los análisis de mutaciones sugieren que existen varias zonas importantes para la exportación de los diferentes RNAs como es la caperuza, el extremo 3', algunas secuencias específicas, etc. Existen proteínas que se unen a esas regiones, lo que crea la duda de si el factor importante es la secuencia o la proteína. Se ha demostrado que las proteínas que se unen a la caperuza de los RNAbpmU son indispensables para la exportación de dichos RNAs. La creación de mutantes en levaduras demostró que algunos factores reguladores de la GTPasa Ran, son necesarios para la exportación de mRNA. Hay algunas proteínas asociadas al pre-mRNA intranuclear que salen con éste al citoplasma y regresan al núcleo, lo que hace suponer que puedan ser acarreadoras. Los mecanismos de exportación RNP son actualmente mucho menos conocidos que los de importación de proteínas (Simos y Hurt, 1995).

En cuanto al papel de las nucleoporinas en los mecanismos de flujo de sustancias en ambos sentidos, se conoce poco. Se ha probado que anticuerpos contra algunas nucleoporinas y la aglutinina del germen de trigo bloquean la importación de proteínas *in vivo* e *in vitro*. También se conocen algunas mutaciones de nucleoporinas de levaduras que suprimen la salida de los mRNA, pero como la mayoría de las nucleoporinas no han sido aisladas ni caracterizadas, todavía se ignora mucho de la forma en que dichas proteínas intervienen en los mecanismos de permeabilidad.

Tal vez la mejor visualización del flujo de sustancias entre el citoplasma y el núcleo la realizaron, con el microscopio electrónico, Feldherr y su grupo, quienes microinyectaron en el citoplasma de ovocitos micelas de oro cubiertas de nucleoplasmina —una proteína que se acumula en el núcleo— y constataron que algunas de ellas entraban al núcleo a través de los poros de la envoltura (Wagner y cols., 1990).

El pasaje de conjuntos macromoleculares mejor estudiados desde el punto de vista estructural es el de la salida del núcleo al citoplasma del RNA mensajero y sus proteínas asociadas. En los núcleos con cromosomas politénicos de las glándulas salivales de larvas de algunos dípteros (Chironomidos), es posible visualizar muy claramente con el microscopio electrónico dichas partículas RNP, los gránulos de Balbiani. La inmunolocalización de una proteína que se une al primer nucleótido —monometil guanosina—

usualmente llamado caperuza, permitió determinar que el extremo 5' del RNA es el que pasa primero por el poro (Visa y cols., 1996). El empleo de tomografía ultraestructural demostró en detalle cómo el gránulo de Balbiani se comienza a desenrollar y la punta de la cinta que aparece —el extremo 5' del mRNA— se relaciona con la parte central del complejo de poro, mientras que el otro extremo parece estar adherido a la periferia del mismo y va girando y desmadejándose a medida que la cinta de RNA es transferida al citoplasma (Mehlin y cols., 1995). Las imágenes obtenidas por espectroscopia de energía de electrones también han permitido una buena visualización de las partículas ribonucleoproteicas que contienen RNA mensajero pasando por el complejo de poro, como se muestra en el esquema de la figura 12-32 (Vázquez Nin y cols., 1997a).

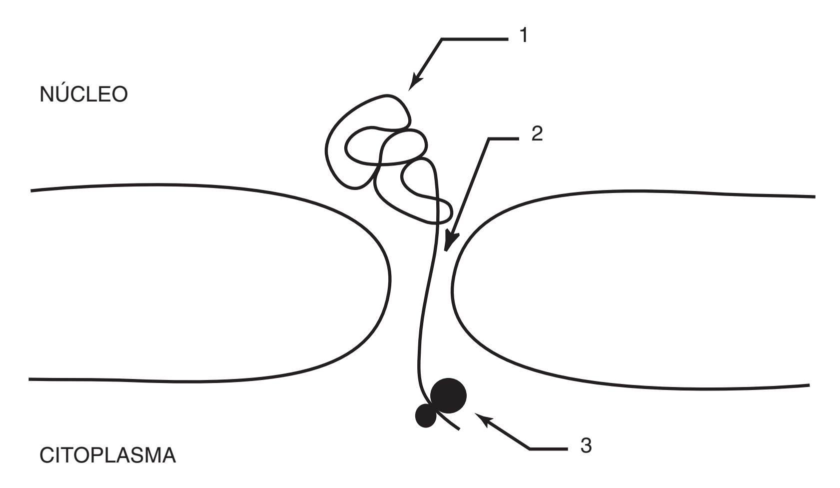


Figura 12-32. Esquema que representa una imagen espectroscópica de energía de electrones, mostrando la distribución del fósforo. En el lado nuclear se observa un gránulo de Balbiani de un núcleo con cromosomas politénicos, situado cerca de un poro de la envoltura nuclear. El gránulo de Balbiani (1) contiene RNA mensajero y se ha desenrollado parcialmente dando lugar a una fibra (2) que atraviesa al poro y llega al citoplasma donde un ribosoma (3) se ha unido a ella.

Referencias bibliográficas

Agredano-Moreno, L.; Jiménez-García, L.F.; Echeverría, O.M.; Martínez, E.; Ramos, C. y Vázquez Nin, G.H., "Cytochemical and immunocytochemical study of nuclear structures of *Lacandonia schismatica*", *Biol. Cell*, **82:** 177-184, 1994.

Allgeier, A.; Offermanns, S.; Van-Sande, J.; Spicher, K.; Schultz, G. y Dumont, J.E., "The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11", *J. Biol. Chem.*, **269:** 13733-13735, 1994.

Bachellerie, J.P.; Puvion, E. y Zalta, E., "Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin-RNA-protein complexes isolated from mammalian cell nuclei", *Eur. J. Biochem.*, **58:** 327-337, 1975.

Berezney, R., "Organization and function of the nuclear matrix", en *Chromosomal nonhistone proteins*, Hnilica, L.S., ed., CRC Press, Boca Ratón, EE.UU., **4:** 119-180, 1984.

——— y Coffey, D.S., "Identification of a nuclear protein matrix. Biochem. Biophys", *Res. Commun.,* **60:** 1410-1417, 1974.

Bernhard, W., "A new staining procedure for electron microscopical cytology", *J. Ultrastruct. Res.*, **27:** 250-265, 1969.

Beyer, A.L.; Bouton, A.H. y Miller, O.L., "Correlation of hnRNP structure and nascent transcript cleavage", *Cell,* **26:** 155-165, 1981.

———; Miller, O.L. y McKnight, S., "Ribonucleoprotein structure in nascent hnRNA is nonrandom and sequence-dependent", *Cell*, **20**: 75-84, 1980.

——— y Osheim Y., "Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts", *Genes and Development*, **2:** 754-765, 1988.

Bouteille, M.; Kalifat, S.R. y Delarue, J., "Ultrastructural variations of nuclear bodies in human diseases", *J. Ultrastruct. Res.*, **19:** 474-486, 1967.

Brasch, K., "Drug and metabolite-induced perturbations in nuclear structure and function: a review", *Biochem. Cell Biol.*, **68:** 408-426, 1990.

———; Harrington, S. y Blake, H., "Isolation and analysis of nuclear bodies from estrogen stimulated chick liver", *Exp. Cell Res.*, **182:** 425-435, 1989.

——— y Ochs, R.L., "Nuclear bodies (NBs): a newly 'rediscovered' organelle", *Exp. Cell Res.*, **202:** 211-223, 1992.

Brown, G.L. y Locke, M., "Nucleoprotein localization by bismuth staining", *Tissue and Cell*, **10:** 365-388, 1978.

Carmo-Fonseca M.; Pepperkok, R.; Sproat, B.S.; Ansorge, W.; Swanson, M.S. y Lamond, A., "In vivo detection of snRNP-organelles in the nuclei of mammalian cells", *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **10:** 1863-1873, 1991b.

———; Tollervey, D.; Pepperkok, R.; Barabino, S.; Merdes, A.; Brunner, C.; Zamore, P.D.; Green, M.R.; Hurt, E. y Lamond, A., "Mammalian nuclei contain foci which are highly enriched in components of pre-mRNA splicing machinery", *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **10:** 195-206, 1991a.

Cogliati, R. y Gautier, A., "Mise en évidence de l'ADN et des polysaccharides à l'aide d'un nouveau réactif 'de type Schiff'", *C.R. Acad. Sci. D.,* **276:** 3041-3044, 1973.

Dale, B.; DeFelice, L.J.; Kyozuka, K.; Santella, L. y Tosti, E., "Voltage clamp of the nuclear envelope", *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **255:** 119-124, 1994.

Daneholt, B., "Pre-mRNP particles: From gene to nuclear pore", *Current Biology,* **9:** R412-R415, 1999.

Driel, R.; Humbel, B. y De Jong, L., "The nucleus: a black box opened", *J. Cell. Biochem.,* **47:** 311-316, 1991.

———; Wansik, D.G.; Steensel, B.; Grande, M.A.; Schul, W. y De Jong, L., "Nuclear domains and the nuclear matrix", *Int. Rev. Cytol.,* **162A:** 151-188, 1995.

Dufau, M.L.; Baukal, A.J. y Catt, K.J., "Hormone induced guanyl nucleotid binding and activation of adenyl cyclase in the Leydig cell", *Proc. Nat. Acad. Sci.*, EE.UU., **77:** 5837-5841, 1980.

Echeverría, O.M.; Hernández-Pando, R. y Vázquez Nin, G.H., "Ultrastructural, cytochemical, and immunocytochemical study of nuclei and cytoskeleton of thyroid papillary carcinoma cells", *Ultrastruct. Pathol.,* **22:** 185-197, 1998.

———; Jiménez-García, L.F.; González-Calderón, G.; Elizundia, J.M. y Vázquez Nin, G.H., "Cytochemical and autoradiographic study of the nucleus of a symbiotic dinoflagellate", *Caryologia,* **46:** 261-274, 1993.

———; Pagán Santini, R. y Vázquez Nin, G.H., "Effects of testosterone on nuclear ribonucleoprotein components of prostate epithelial cells", *Biol. Cell,* **72:** 223-229, 1991.

Edström, J.E. y Tanguay, R., "Cytoplamic ribonucleic acids with messenger characteristics in salivary gland cells of *Chironomus tentans*", *J. Mol. Biol.,* **84:** 569-583, 1974.

Esquivel, C.; Vázquez Nin, G.H. y Echeverría, O.M., "Evidence of repetitive patterns of chromatin distribution in cell nuclei of rat liver", *Acta Anat.,* **136:** 94-98, 1989.

Fakan, S., "Structural support for RNA synthesis in the cell nucleus", en *Methods and achievements in experimental pathology*, Jasmin, G. y Simard, R., eds., Nuclear submicroscopy, Karger, Basel, **12:** 102-140, 1986.

———; Leser, G. y Martin, T., "Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry in thin sections", *J. Cell Biol.,* **98:** 358-363, 1984.

———; Leser, G. y Martin, T., "Immunoelectron microscope visualization of nuclear antigens within spread transcription complexes", *J. Cell Biol.,* **103:** 1153-1157, 1986.

———; Puvion, E. y Spohr, G., "Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes", *Exp. Cell Res.,* **99:** 155-164, 1976.

——— y Bernhard, W., "Localization of rapidly labeled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography", *Exp. Cell Res.,* **67:** 129-141, 1971.

——— y Bernhard, W., "Nuclear labelling after prolonged ^{3}H-uridine incorporation as visualized by high resolution autoradiography", *Exp. Cell Res.,* **79:** 431-444, 1973.

——— y Puvion, E., "The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution", *Int. Rev. Cytol.,* **65:** 255-300, 1980.

Fuchs, E. y Weber, K., "Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease", *Annu. Rev. Biochem.,* **63:** 345-382, 1994.

González-Oliver, A.; Echeverría, O.M.; Hernández-Pando, R. y Vázquez Nin, G.H., "Ultrastructural study of the nucleus of normal, dysplastic, and carcinomatous epithelial cells of human cervix uteri", *Ultrastruct. Pathol*., 1997.

Gray, M.W., "The endosymbiont hypothesis revisited", *Int. Rev Cytol.,* **141:** 233-357, 1992.

Huang, S. y Spector, D., "Nascent pre-mRNA transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors", *Genes Dev.,* **5:** 2288-2302, 1991.

Jacob, M.; Devilliers, G.; Fuchs, J.P.; Gallinaro, H.; Gattoni, R.; Judes, C. y Stevenin, J., "Isolation and structure of the ribonucleoprotein fibrils containing heterogenous RNA", en *The Cell Nucleus*, Busch, H., ed., Academic Press, Nueva York, **8:** 194-246, 1981.

Jagatheesan, G.; Thanumalayan, S.; Muralikrishna, Bh.; Rangaraj, N.; Karande, A.A. y Parnaik, V.K., "Colocalization of intranuclear lamin foci with RNA splicing factors", *J. Cell Sci.,* **112:** 4651-4661, 1999.

Jiménez-García, L.F.; Agredano-Moreno, L.; Segura-Valdez, L.; Echeverría, O.M.; Martínez, E.; Ramos, C.H. y Vázquez Nin, G.H., "The ultrastructural study of the interphase nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae-:Triuridales) reveals a non-typical extranucleolar particle", *Biol. Cell,* **75:** 101-110, 1992.

———; Elizundia, J.M.; López-Zamorano, B.; Maciel, A.; Zavala, G.; Echeverría, O.M. y Vázquez Nin, G.H., "Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protoctists", *BioSystems,* **22:** 103-116, 1989.

——— y Spector, D., "In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism", *Cell,* **73:** 47-59, 1993.

Koken, M.; Puvion-Dutilleul, F.; Guillemin, M.; Viron, A.; Linares-Cruz, G.; Stuurman, N.; De Jong, L.; Szostecki, C.; Calvo, F.; Chomienne, C.; Degos, L.; Puvion, E. y de Thé., "The t(15:17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion", *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **13:** 1073-1083, 1994.

Kopecny, V.; Biggiogera, M.; Laurinck, J.; Pivko, J.; Grafenau, P.; Martin, T.E.; Fu, X.D. y Fakan, S., "Fine structural cytochemical and immunocytochemical analysis of nucleic acids and ribonucleoprotein distribution in nuclei of pig oocytes and early preimplantation embryos", *Chromosoma,* **104:** 561-574, 1996.

Krishan, A.; Uzman, B.G. y Hedley-Whyte, E.T., "Nuclear bodies: a component of cell nuclei in hamster tissues and human tumors", *J. Ultrastruct. Res.,* **19:** 563-572, 1967.

Lamond, A.I. y Earnshaw, W.C., "Structure and function in the nucleus", *Science,* **280:** 547-553, 1998.

LeStourgeon, W.; Lothstein, L.; Walker, B.W. y Beyer, A.L., "The composition and general topology of RNA and protein in monomer 40 S ribonucleoprotein particles", *The Cell Nucleus*, Busch H., ed., Academic Press, Nueva York, **9**, 1981.

Leung, P.C.K. y Steele, G.L., "Intracellular signaling in the gonads", *Endocrine Rev.,* **13:** 476-498, 1992.

López Velázquez, G.; Márquez, J.; Ubaldo, E.; Corkidi, G.; Echeverría, O.M. y Vázquez Nin, G.H., "Three-dimensional analysis of the arrangement of compact chromatin in the nuclei of G_0 lymphocytes", *Histochem. Cell Biol.,* **105:** 153-161, 1996.

Luck, B.T. y Lafontaine, J.G., "An ultracytochemical study of nuclear bodies in meristematic plant cells (*Cicer arietinum*)", *Can. J. Bot.,* **60:** 611-619, 1982.

Lymangrover, J.R; Matthews, E.K. y Saffran, M., "Membrane potential changes of mouse adrenal zona fasciculata cells in response to adrenocorticotropin and adenosine 3', 5'-monophosphate", *Endocrinology,* **110:** 462-468, 1982.

Malatesta, M.; Zancanaro, C.; Martin, T.E.; Chan, E.K.L.; Amalric, F.; Lührmann, R.; Vogel, P. y Fakan, S., "Is the coiled body involved in nucleolar functions?", *Exp. Cell Res.,* **211:** 415-419, 1994a.

———— ; Zancanaro, C.; Martin, T.E.; Chan, E.K.L.; Amalric, F.; Lührmann, R.; Vogel, P. y Fakan, S., "Cytochemical and immunocytochemical characterization of nuclear bodies during hibernation", *Eur. J. Cell Biol.,* **65:** 82-93, 1994b.

Matzke, A.J.M.; Weiger, T.M. y Matzke, M.A., "Detection of a large cation-selective channel in nuclear envelopes of avian erythrocytes", *FEBS Letters,* **271:** 161-164, 1990.

Medina, M.A.; Moreno Díaz de la Espina, S.; Martín, M. y Fernández-Gómez, M.E., "Interchromatin granules in plant nuclei", *Biol. Cell,* **67:** 331-339, 1989.

Mehlin, H.; Daneholt, B. y Skoglund, U., "Structural interaction between the nuclear pore complex and a specific translocating RNP particle", *J. Cell Biol.,* **129:** 1205-1216, 1995.

Mínguez, A.; Franca, S. y Moreno Díaz de la Espina, S., "Dinoflagellates have a eukaryotic nuclear matrix with lamin-like proteins and topoisomerase II", *J. Cell Science,* **107:** 2861-2873, 1994.

Misrahi, M.; Hai, M.T.V.; Ghinea, N.; Loosfelt, H.; Meduri, G.; Atger, M.; Jolivet, A.; Gross, B.; Savouret, J.F.; Dessen, P. y Milgrom, E., "Molecular and cellular biology of gonadotropin receptors", en *The Ovary,* Adashi, E.Y. y Leung, P.C., eds., Raven Press, Nueva York, 57-90, 1993.

———— ; Loosfelt, H.; Atger, M.; Vu-Hai, M.T.; Gross, B.; Meduri, G.; Jolivet, A. y Milgrom, E., "Recepteurs de la LH et de la TSH. Une nouvele famille de recepteurs couplés à des proteines G", *Ann Biol. Clin. Paris,* **50:** 229-232, 1992.

Monneron, A. y Bernhard, W., "Fine structural organization of the interphase nucleus of some mammalian cells", *J. Ultrastruct. Res.,* **27:** 266-288, 1969.

——— y Moulé, Y., "Étude ultrastructurale de particules ribonucléoprotéiques nucléaires isolées à partir du foie de rat.", *Exp. Cell Res.,* **51:** 531-554, 1968.

Moreno Díaz de la Espina, S., "Nuclear matrix isolated from plant cells", en International Review of Cytology, Structural and functional organization of the nuclear matrix, Berzney, R. y Jeon, K.W., eds., Academic Press. Inc., 75-739, 1995.

———; Barthellemy, I. y Cerezuela, M.A., "Isolation and characterization of the residual nuclear matrix in a plant cell system", *Chromosoma,* **100:** 110-117, 1991.

———; Risueño, M.C. y Medina, F.J., "Ultrastructural, cytochemical and autoradiographic characterization of coiled bodies in the plant cell nucleus", *Biol. Cell,* **44:** 229-238, 1982.

Moyne, G.; Bertaux, O. y Puvion, E., "The nucleus of Euglena I. An ultracytochemical study of the nucleic acids and nucleoproteins of synchronized *Euglena gracilis*", J. *Ultrastruct. Res.,* **52:** 362-376, 1975.

———; Nash, R.E. y Puvion, E., "Perichromatin granules and other nuclear components in isolated rat hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide", *Biol. Cell,* **30:** 5-16, 1977.

Ochs, R.; Stein, T.W.; Andrade, L.E.C.; Gallo, D.; Chan, E.K.L., Tan, E.M. y Brasch, K., "Formation of nuclear bodies in hepatocyes of estrogen-treated roosters", *Mol. Biol. Cell,* **6:** 345-356, 1995.

———; Stein, T.W. y Tan, E.M., "Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells", *J. Cell Science,* **107:** 385-399, 1994.

Osheim, Y.N.; Miller, O.L. y Beyer, A.L., "RNP particles at the slice junction sequences on *Drosophila* chorion transcripts", *Cell,* **43:** 143-151, 1985.

Panté, N. y Aebi, U., "Exploring nuclear pore complex structure and function in molecular detail", *J. Cell Sci.,* **19:** 1-11, 1995.

Pederson, T., "Thinking about a nuclear matrix", *J. Mol. Biol.,* **277:** 147-159, 1998.

———, "Half century of 'The Nuclear Matrix'", *Mol. Biol. Cell,* **11:** 799-805, 2000a.

———, "Duffusional protein transport within the nucleus: a message in the medium", *Nature Cell Biol.,* **2:** E73-E74, 2000b.

Petrov, P. y Bernhard, W., "Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoproteic components of interphase nucleus", *J. Ultrastruct. Res.,* **35:** 486-502, 1971.

Politz, J.C.; Browne, E.S.; Wolf, D. y Pederson, T., "Intranuclear diffusion and hybridization state of oligonucleotides measured by fluorescence correlation spectroscopy in living cells", *Proc. Nat. Acad. Sci.,* **95:** 6043-6048, 1998.

———; Tuft, R.A.; Pederson, T. y Singer, R.H., "Movement of nuclear poly(A) throughout the interchromatin space in living cells", *Curr. Biol.,* **9:** 285-291, 1999.

Popoff, N. y Stewart, S., "The fine structure of nuclear inclusions in the brain of experimental golden hamsters", *J. Ultrastruct. Res.* **23:** 347-361, 1968.

Puvion, E.; Bachellerie, J.P. y Burglen, M.J., "Nucleolar perichromatin granules induced by dichlorobenzimidazole riboside", *J. Ultrastruct. Res.,* **69:** 1-12, 1979.

———; Moyne, G. y Bernhard, W., "Action of 3'deoxyadenosine (cordycepin) on the nuclear ribonucleoproteins of isolated cells", *J. Microscop. Biol. Cell,* **25:** 17-32, 1976.

———; Viron, A.; Assens, C.; Leduc, E. y Jeanteur, Ph., "Immunocytochemical identification of nuclear structures containing snRNP in isolated liver cells", *J. Ultrastruct. Res.,* **87:** 180-189, 1984.

——— y Lange, M., "Functional significance of perichromatin granules accumulation induced by cadmium chloride in isolated rat liver cells", *Exp. Cell Res.,* **128:** 47-58, 1980.

——— y Moyne, G., "Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. A high resolution quantitative autoradiographical and cytochemical study", *Exptl. Cell Res.* **115:** 79-88, 1978.

——— y Moyne, G., "*In situ* localization of RNA structures", en *The Cell Nucleus,* Busch, H., ed., Academic Press, Nueva York, 59-116, 1981.

——— y Viron, A., "*In situ* structural and functional relationships between chromatin pattern and RNA structures involved in non-nucleolar chromatin transcription" *J. Ultrastruct. Res.,* **74:** 351-360, 1981.

Puvion-Dutilleul, F.; Besse, S.; Chan, E.K.; Tan, E.M. y Puvion, E., "p80-coilin: a component of coiled bodies and interchromatin granule-associated zones", *J. Cell Science,* **108:** 1143-1153, 1995.

——— y Puvion, E., "Sites of transcription of adenovirus type 5 genomes in relation to early viral DNA replication in infected HeLa cells. A high resolution *in situ* hybridization and autoradiographical study", *Biol. Cell,* **71:** 135-147, 1991.

Raška, I.; Ochs, R.L.; Andrade, L.E.C.; Chan, E.K.L.; Burlingame, R.; Peebles, C.; Gruol, D. y Tan, E.M., "Association between the nucleolus and the coiled body", *J. Structural Biology,* **104:** 120-127, 1990.

Saez, J.M., "Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation", *Endocrine Reviews,* **15:** 574-626, 1994.

Samarina, O.P; Krichevskaya, A.A. y Georgiev, G.P., "Nuclear ribonucleoprotein particles containing messenger ribonucleic acid", *Nature,* **210:** 319-322, 1966.

———; Lukanidin, E.M.; Molnar, J. y Georgiev, G.P., "Structural organization of nuclear complexes containing DNA-like RNA", *J. Mol. Biol.,* **33:** 251-263, 1968.

——— y Krichevskaya, A.A., "Nuclear 30 S RNP particles", en *The Cell Nucleus*, Busch, H., ed., Academic Press, Nueva York, **9,** 1981.

Segaloff, D. y Ascoli, M., "The luteotropin/choriogonadothopin receptor... 4 years later", *Endocrine Rev.,* **14:** 324-347, 1993.

Shaver, J.K.; Tezelman, S.; Siperstein, A.E.; Duh, Q.Y. y Clark, O.H., "Thyroid-stimulating hormone activates phospholipase C in normal and neoplastic thyroid tissue", *Surgery,* **114:** 1064-1069, 1993.

Shiomi, Y.; Powers, J.; Bolla, R.I.; Van Nguyen, T. y Schlessinger, D., "Protein and RNA in mouse L cell core nucleoli and nucleolar matrix", *Biochemistry,* **25:** 5745-5751, 1986.

Simos, G. y Hurt, E.C., "Nucleocytoplasmic transport: factors and mechanisms", *FEBS Letters,* **369:** 107-112, 1995.

Singh, O.P.; Björkroth, N.; Masich, S.; Wieslander, L. y Daneholt, B., "The intranuclear movement of Balbiani ring premessenger ribonucleoprotein particles", *Exp. Cell Res.,* **251:** 135-146, 1999.

Sogin, M.L., "The origin of eukaryotes and evolution into major kingdoms", en *Early Life on Earth*, Bengtson, S., ed., Columbia University Press, Nueva York, 181-192, 1994.

Sommerville, J., "Immunolocalization and structural organization of nascent RNP", en *The Cell Nucleus Busch H.*, ed., Academic Press, Nueva York, **8,** 1981.

Swift, H., "Studies on nuclear fine structure", *Brookhaven Symp. Biol.,* **12:** 134-152, 1959.

Talcott, B. y Moore, M.S., "Getting across the nuclear pore complex", *Trends in Cell Biol.,* **9:** 312-318, 1999.

Truss, M. y Beato, M., "Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors", *Endocrine Rev.,* **14:** 459-479, 1993.

Urquhart, J., "Physiological actions of adrenocorticotropic hormone", en *Handbook of Physiology,* Geiger, S., ed., Am. Physiol. Soc., Washington D.C., **4,** Parte 2, 133-404, 1974.

Vázquez Nin, G.H.; Abolhassani-Dadras, S.; Echeverría, O.M.; Boutinard-Rouelle-Rossier, V.; Von Shack, M.L. y Fakan, S., "Electron spectroscopic imaging analyses of the distribution of phosphorus in Balbiani ring granules and in the surrounding nucleoplasm", *Chromosoma,* **105:** 360-368, 1997a.

———; Abolhassani-Dadras, S.; Echeverría, O.M.; Boutinard Rouelle-Rossier, V. y Fakan, S., "Phosphorus distribution in perichromatin granules and surrounding nucleoplasm as visualized by electron spectroscopic imaging", *Biol. Cell,* **87:** 171-177, 1996.

———; Biggiogera, M. y Echeverría, O.M., "Activation of osmium ammine by SO_2-generating chemicals for electron microscopy Feulgen-type staining of DNA", *Eur. J. Histochemistry,* **39:** 101-106, 1995.

———; Chávez, B. y Tomás Martín, C., "A preferential staining method for chromatin in electron microscopy", *J. Microscopie,* **16:** 243-246, 1973.

———; Echeverría, O.M.; Fakan, S.; Leser, G. y Martin, T.E., "Immunoelectron microscope localization of snRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus thummi*", *Chromosoma,* Berlín, **99:** 44-51, 1990.

———; Echeverría, O.M.; Fakan, S.; Leser, G. y Martin, T.E., "Immunocytochemical characterization of nuclear ribonucleoprotein polyparticles in cells of the central nervous system of the rat", *Eur. J. Cell Biol.,* **65:** 291-297, 1994.

———; Echeverría, O.M.; Mínguez, A.; Moreno Díaz de la Espina, S.; Fakan, S. y Martin, T.E., "Ribonucleoprotein components of root meristematic cell nuclei of the tomato characterized by application of mild loosening and immunocytochemistry", *Exp. Cell Res.,* **200:** 431-438, 1992.

———; Echeverría, O.M.; Molina, E. y Fragoso, J., "Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells", *Acta Anat.,* **102:** 308-318, 1978.

———; Echeverría, O.M.; Ortiz, R.; Ubaldo, E. y Fakan, S., "Effects of FSH, LH, TSH, and ACTH on transcription and exportation of RNA to the cytoplasm", *Chromosoma*. Aceptado para publicación.

———; Echeverría, O.M. y Pedron, J., "Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells", *Biol. Cell,* **35:** 221-228, 1979.

———; Echeverría, O.M.; Zavala, G.; Jiménez-García, L.F.; González, M.A. y Parra, R., "Relations between nucleolar morphometric parameters and pre-rRNA synthesis in animal and plant cells", *Acta Anatomica,* Basilea, **126:** 141-146, 1986.

———; Jiménez-García, L.F.; Echeverría, O.M.; Guzmán, A.; Coeto-Barona, G. y Nava-Ruiz, C., "Correlation of the changes of the frequency of perichromatin granules with the RNA content of the interchromatin region of the uterine cells in normal and ovariectomized rats. A high resolution *in situ* hybridization and stereological study", *Biol. Cell,* **91:** 109-115, 1999.

———; Ortega Rangel, J.A.; Echeverría, O.M.; Parra, M. del R. y Jiménez-García, L.F., "Changes in nuclear ribonucleoprotein constituents and chromatin disposition during neuronal differentiation and maturation", *Biol. Cell,* **48:** 17-24, 1983.

———; Ortega Rangel, J.A. y Echeverría, O.M., "Nuclear aspects of neuroblast differentiation in the chick embryo", *Biol. Cell.,* **39:** 143-146, 1980.

———; Ortiz, A.; López, A. y Echeverría, O.M., "Electron microscope study of ribonucleoprotein polyparticles and their relation to perichromatin granules", *Biol. Cell,* **65:** 133-138, 1989.

——— y Bernhard, W., "Comparative ultrastructural study of perichromatin- and Balbiani ring granules", *J. Ultrastruct.,* **36:** 842-860, 1971.

——— y Echeverría, O.M., "The polytene nucleus in morphological, cytochemical, and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation", *Review. Eur. J. Histochem.,* **40:** 7-16, 1996.

Verheijen, R.; Kuijpers, H.; Vooijs, P.; Venrooij, W. y Ramaekers, F., "Distribution of the 70K UI RNA-associated protein during interphase and mitosis", *J. Cell Sci.,* **86:** 173-190, 1986.

Visa, N.; Izaurralde, E.; Ferreira, J.; Daneholt, B. y Mattaj, I.W., "A nuclear cap-binding complex binds Balbiani ring pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export", *J. Cell Biol.,* **133:** 5-14, 1996.

———; Puvion-Dutilleul, F.; Bachellerie, J.P. y Puvion, E., "Intranuclear distribution of U1 and U2 snRNAs visualized by high resolution *in situ* hybridization: revelation of a novel compartment containing U1 but not U2 snRNA in HeLa cells", *Eur. J. Cell Biol.,* **60:** 308-321, 1993a.

———; Puvion-Dutilleul, F.; Harper, F.; Bachellerie, J.P. y Puvion, E., "Intranuclear distribution of poly(A) RNA determined by electron microscope *in situ* hybridization", *Exp. Cell Res.,* **208:** 19-34, 1993b.

Wagner, P.; Kunz, J.; Koller, A. y Hall, M.N., "Active transport of proteins into the nucleus", *FEBS Letters,* **275:** 1-5, 1990.

Ward, W.S. y Coffey, D.S., "DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells", *Biol. Reproduction,* **44:** 569-574, 1991.

Watson, M.L., "Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse", *J. Cell Biol.,* **13:** 162-167, 1962.

Weber, A.; Whipp, S.; Usenik, E. y Frommes, S., "Structural changes in the nuclear body in the adrenal gland zona fasciculata of the calf following the administration of ACTH", *J. Ultrastruct. Res.,* **11:** 564-576, 1964.

Weiguo, S., "Early multicellular fossils", en *Early Life on Earth,* Bengtson, S. ed., Columbia Univ. Press, 358-369, 1994.

Weis, K.; Rambaud, S.; Lavau, C.; Carmo-Fonseca, M.; Lamond, A. y Dejean, A., "Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RARα in acute promyelocytic leukemia cells", *Cell,* **76:** 345-356, 1994.

Wray, G.A.; Levinton, J.S. y Shapiro, L.H., "Molecular evidence for deep precambrian divergences among metazoan Phyla", *Science,* **274:** 568-573, 1996.

Xing, Y.; Johnson, C.V.; Dobner, P. y Lawrence, J.B., "Higher level organization of individual gene transcription and RNA splicing", *Science,* **259:** 1326-1330, 1993.

———; Johnson, C.V.; Moen, P.; McNeil, J. y Lawrence, J.B., "Nonrandom gene organization: Structural arrangements of specific pre-mRNA transcription and splicing with SC-35 domains", *J. Cell Biol.,* **131:** 1635-1647, 1995.

Yamamoto, K.R., "Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks", *Annu. Rev. Genet.,* **19:** 209-252, 1985.

Zavala, G.; Aguilar, X.; Jiménez-García, L.F.; Echeverría, O.M. y Vázquez Nin, G.H., "Changes in the ribonucleoprotein constituents of the nucleus during differentiation of muscle cells in the chick embryo", *Biol. Cell,* **76:** 159-165, 1992.

Zhong, S.; Salomoni, P. y Pandolfi, P.P., "The transcriptional role of PML and the nuclear body", *Nature Cell Biol.,* **2:** E85-E90, 2000.

Zong, R.T.; Das, Ch. y Tucker, P., "Regulation of matrix attachment region-dependent, lymphocyte-restricted transcription through differential localization within promyelocytic leukemia nuclear bodies", *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **19:** 4123-4133, 2000.

CAPÍTULO 13

EL RIBOSOMA: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Estela Sánchez Quintanar



Introducción

El proceso de síntesis de proteínas, conocido también como traducción de la información genética, se lleva a cabo en las células de los organismos en una maquinaria biológica universal muy compleja, llamada en su conjunto aparato traductor. Este proceso involucra una serie de reacciones que permiten la decodificación de la información genética contenida en las moléculas de los transcritos o RNA mensajeros (mRNA), correspondientes a cada proteína que va a ser sintetizada. Participan en este proceso enzimas, cofactores proteicos y no proteicos, moléculas de RNA de transferencia (tRNA), los transcritos arriba mencionados y los ribosomas. Estos últimos son partículas ribonucleoproteicas que constituyen la parte central del aparato traductor, ya que es en estas partículas donde ocurren la mayoría de las reacciones del proceso de traducción, principalmente aquellas que conducen a la formación de los enlaces peptídicos y a la liberación de la proteína formada.

En este capítulo se hará una descripción sintetizada del conocimiento que se tiene actualmente de los ribosomas, de su composición y estructura, así como de los aspectos más relevantes de su función.



Composición molecular de los ribosomas

Los ribosomas son organelos compuestos de RNAs y proteínas los cuales se asocian para formar una estructura compleja. Son tres las clases de ribosomas más estudiadas que se denominan ribosomas de eubacterias, arqueobacterias y eucariontes. Los ribosomas de las eubacterias y las arqueobacterias son notablemente similares en tamaño, forma y composición, aunque los ribosomas arqueobacterianos tienen estructuras características que los distinguen de las eubacterias. Los ribosomas eucariónticos, por otra parte, son similares a los ribosomas eubacterianos en cuanto a la forma; sin

> Los ribosomas son organelos compuestos de RNAs y proteínas.

embargo, se distinguen de los anteriores en que, en términos generales, son más grandes y más complejos, en especial los de los vertebrados y los de las plantas florales. Los tres tipos de ribosomas están formados por dos subunidades de desigual tamaño y en los tres casos estas estructuras llevan a cabo básicamente la misma función de traducción. Las formas de ribosomas más estudiadas son las de eubacteria y más recientemente también se han logrado avances muy significativos en las de eucariontes. Los ribosomas de estos organismos se identifican como 70S y 80S respectivamente, y será a ellos a los que nos referiremos en el resto del capítulo.

Ribosomas de eubacterias

Las células de eubacterias contienen aproximadamente unos 15,000 a 20,000 ribosomas.

Las dos subunidades del ribosoma se conocen como 30S la pequeña y 50S la subunidad grande.

Las células de eubacterias, especialmente las de *E. coli*, que es el prototipo más estudiado, contienen aproximadamente unos 15,000 a 20,000 ribosomas, los cuales constituyen casi la cuarta parte del peso seco total de la bacteria. Estos ribosomas, con un diámetro de 18 nm, contienen aproximadamente 65% de RNA y 35% de proteínas cuyas masas moleculares varían entre 6,000 y 75,000 kDa. Las dos subunidades del ribosoma se conocen como 30S la pequeña y 50S la subunidad grande, debido a su velocidad de sedimentación en un campo gravitacional. Estas dos subunidades, 30S y 50S, se combinan para formar un ribosoma (monosoma) de una masa molecular de 2.5×10^6 kDa, un diámetro de 200 Å y un coeficiente de sedimentación de 70S (figura 13-1).

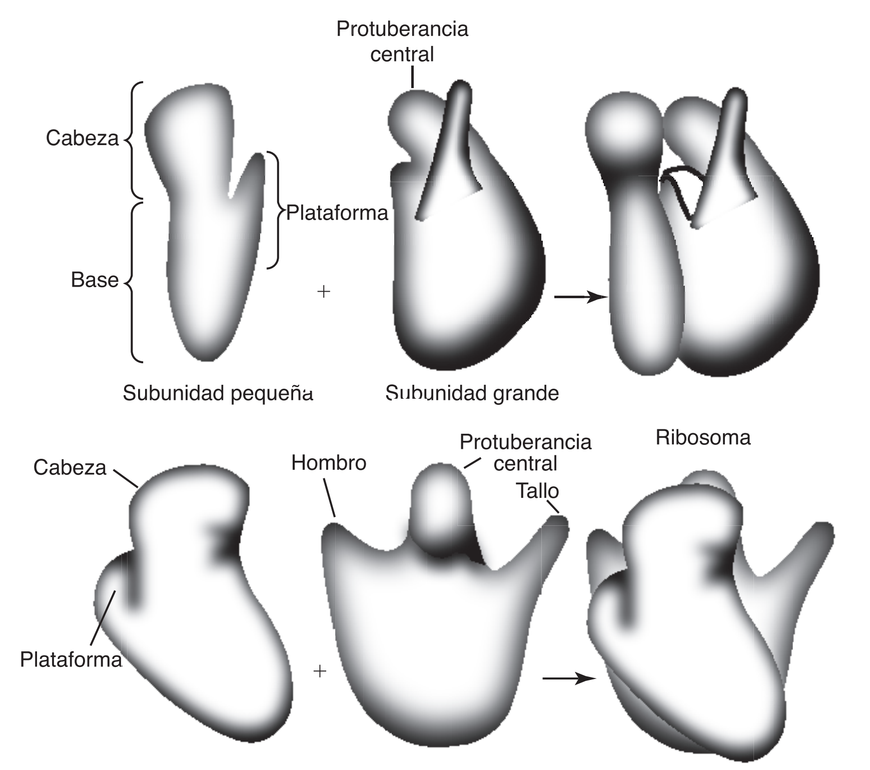


Figura 13-1. Modelo esquemático de las dos subunidades que conforman un ribosoma. La subunidad pequeña (extremo izquierdo) muestra las 3 partes características de esta subunidad conocidas como: la cabeza, la base y la plataforma. La subunidad grande (centro) incluye la protuberancia central y, a los lados, el hombro y tallo, respectivamente, en la parte superior vista de perfil y en la parte inferior de frente. En el extremo derecho se muestra un ribosoma completo que en eubacteria mide aproximadamente 250 Å.
Tomado de: Lake, J.A. (1985.)

La subunidad 30S es alargada y asimétrica y la subunidad 50S es más gruesa y un poco más corta que la subunidad 30S. La subunidad 30S contiene una molécula de RNA de 16S, compuesta de una cadena de aproximadamente 1,550 nucleótidos, aunque su longitud exacta varía de especie a especie, en la que existen regiones de secuencias altamente conservadas. Así mismo, grandes regiones de esta molécula presentan estructuras secundarias que son muy similares entre los diferentes tipos de ribosomas, las cuales se consideran fundamentales para la función del ribosoma. De hecho, estas secuencias de necleótidos tan conservadas han permitido la construcción de árboles filogenéticos de los organismos vivientes (Lake, 1985).

La subunidad 50S, por otra parte, contiene dos moléculas de RNA: una grande de 23S compuesta de 2,900 a 3,000 nucleótidos y otra pequeña, la 5S, la cual está formada por una secuencia de 120 nucleótidos. Estas moléculas de RNA ribosomal (rRNA) constituyen más de la mitad del peso del ribosoma y tienen un papel central en las actividades catalíticas del ribosoma (tabla 13-1).

Tabla 13-1. Componentes moleculares de los ribosomas.

Monosomas	Subunidades	rRNAs	Proteínas
Procariontes 70S	30S	16S	21
	50S	23S + 5S	33
Eucariontes 80S	40S	18S	34
	60S	28S + 5S + 5.8S	49 aprox.

En cuanto a la parte proteica de estas dos partículas, se sabe que está constituida por proteínas en general muy básicas, en un número variable según las especies estudiadas. Para eubacterias, las proteínas descritas en la subunidad pequeña son 21 diferentes. La nomenclatura que se usa generalmente consiste en denominar a cada proteína con la letra S (*small*) seguida de un número sucesivo de la S1 a la S21. Por otra parte, para la subunidad grande se han reportado 34, las cuales son denominadas con la letra L (*large*) seguida de números sucesivos de la L1 a la L34. En ambos casos, las proteínas están presentes en una sola copia por subunidad ribosómica, con excepción de las llamadas proteínas ácidas del ribosoma, ubicadas en la subunidad grande, las proteínas L7 y L12, que se encuentran en dos copias de cada una por ribosoma.

Las moléculas de rRNA han sido secuenciadas en muchas de las bacterias y se conoce que forman una estructura tridimensional definida, sostenida por uniones de pares de bases entre sus cadenas. Muchas de las proteínas ribosomales están en contacto directo con el RNA, presentando interacciones proteína-RNA y están localizadas de modo específico en regiones donde existe estructura secundaria del RNA. Otras forman contactos proteína-proteína, y sólo se ensamblan dentro del complejo ribonucleoproteico cuando existen otras proteínas ribosómicas ya formando parte de la estructura, siguiendo un orden preestablecido. Investigaciones recientes por análisis de densidad electrónica han permitido obtener la estructura tri-

dimensional del ribosoma de procariontes y establecer las interacciones proteína-proteína y proteína-RNA (Wimberly y cols., 2000).

Ribosomas de eucariontes

El ribosoma de organismos eucariontes (80S) está formado por dos subunidades de diferente tamaño que se conocen como de 40S y 60S.

La subunidad pequeña de 40S contiene unas 33 proteínas y una sola molécula de RNA que es conocida como 18S.

La subunidad ribosomal grande, la 60S, contiene aproximadamente 49 moléculas diferentes de proteínas.

El ribosoma de organismos eucariontes (80S) tiene una masa molecular de 4.2×10^6 kDa y está formado también por dos subunidades de diferente tamaño que se conocen como de 40S y 60S. La subunidad pequeña de 40S es análoga a la subunidad 30S del ribosoma de eubacteria y contiene unas 33 proteínas y una sola molécula de RNA que es conocida como 18S de 1,900 nucleótidos. Como en el caso de eubacterias, la cadena 18S de eucariontes forma una estructura tridimensional muy semejante a la del 16S, a pesar de que no hay una gran homología entre las dos moléculas a nivel de las secuencias necleotídicas.

La subunidad ribosomal grande, la 60S, contiene aproximadamente 49 moléculas diferentes de proteínas básicas que, al igual que las de la subunidad pequeña, pueden variar en número, dependiendo de la especie biológica en estudio, además de las dos proteínas ácidas antes mencionadas. En este caso, las proteínas ácidas, correspondientes a la L7 y L12 de eubacteria, son denominadas P1 y P2, debido a que sólo en ribosomas eucariónticos estas proteínas están fosforiladas. Asimismo, hay otra proteína correspondiente a la L10, que también es fosfoproteína en eucariontes y que comparte una zona de homología con las proteínas P1 y P2, por lo que se denomina P0 (Wool y cols., 1991). El resto de las proteínas son igualmente designadas por las letras S o L, según la subunidad de que se trate, y un número consecutivo, como se explicó en el caso de los ribosomas de procariontes. En la nomenclatura del sistema de eucariontes se antepone a la letra correspondiente a estas proteínas una letra *e* minúscula para diferenciarlas de las proteínas de los ribosomas de procariontes. En cuanto al contenido de RNA, en la subunidad grande existen tres moléculas diferentes, una de 28S de 4,700 nucleótidos, equivalente a la 23S de procariontes, otra de 5S como se mencionó anteriormente para la subunidad 50S, y otra más, que no tiene contraparte directa en el ribosoma bacteriano, de 5.8S, la cual tiene una longitud de alrededor de 160 nucleótidos (tabla 13-1).

La elucidación de las secuencias de aminoácidos de cada una de las proteínas que forman a los ribosomas ha sido una labor de múltiples grupos de investigación. Parte de esta información se ha logrado obtener directamente de la secuenciación de algunas proteínas purificadas; la mayoría, sin embargo, corresponde a la secuencia de aminoácidos deducida de secuenciar los cDNAs correspondientes. La información obtenida hasta ahora ha permitido constatar que muchas de las proteínas ribosomales provienen de ancestros comunes que en su mayoría han sido conservadas a lo largo de la evolución, de tal modo que presentan gran homología entre las especies de eucariontes, al igual que las de eubacterias entre sí. Sin embargo, algunas de ellas parecen no estar sometidas a una gran presión evolutiva.



Estructura tridimensional del ribosoma y topografía de sitios funcionales

Los estudios encauzados a entender la estructura tridimensional de los ribosomas son difíciles, dada la complejidad de esta partícula ribonucleoproteica. Por ello, la mayoría de los conocimientos que se tienen hasta ahora en esta materia se han realizado en ribosomas de procariontes que son los que presentan menor grado de dificultad, en particular en el ribosoma de *E. coli*. En años recientes, sin embargo, el conocimiento en relación a la estructura de los ribosomas 80S ha avanzado significativamente.

La obtención de cristales tridimensionales de los ribosomas 70S, aunada a resultados de otros estudios de microscopia de densidad electrónica ha permitido integrar la estructura global del ribosoma, describir la topografía de su superficie y localizar la posición de las moléculas de proteínas y RNAs que lo constituyen. Este progreso espectacular es el resultado de la aplicación de una amplia gama de técnicas en muchos laboratorios.

Como resultado de todas estas investigaciones se ha podido observar a la subunidad 30S como una unidad asimétrica, en donde se visualizan claramente las características estructurales que definen a esta partícula, como son la región llamada cabeza y la base, separadas por una zona angosta como cuello. En la parte más ancha de la partícula se observa una hendidura profunda flanqueada hacia el exterior por la zona denominada plataforma, que es una de las regiones mejor mapeada y definida en el ribosoma (figura 13-2) (Clemons y cols., 1999). En relación con la partícula mayor, la 50S, estudios recientes con metodologías de alta resolución permitieron confirmar la forma general de esta estructura y, sobre todo, localizar los espacios entre los dominios más grandes, la posición de las proteínas L7/L12 en el llamado tallo basal y la protuberancia central de la subunidad grande

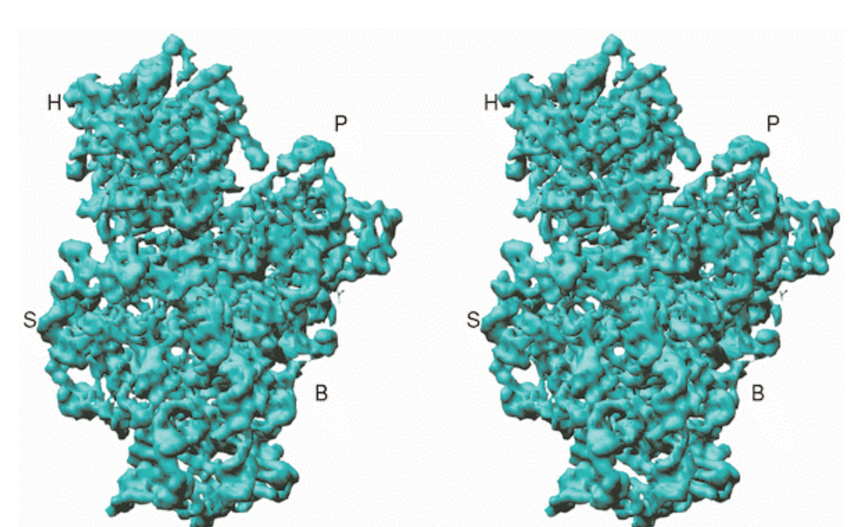


Figura 13-2. Mapa de densidad electrónica de la subunidad 30S a una resolución de 5.5 Å. Vista de la subunidad 30S por el frente y por atrás. Las regiones importantes están indicadas como H (cabeza), P (plataforma), S (hombro), y B (base). Tomado de: Clemons y cols., 1999. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta foto a color.

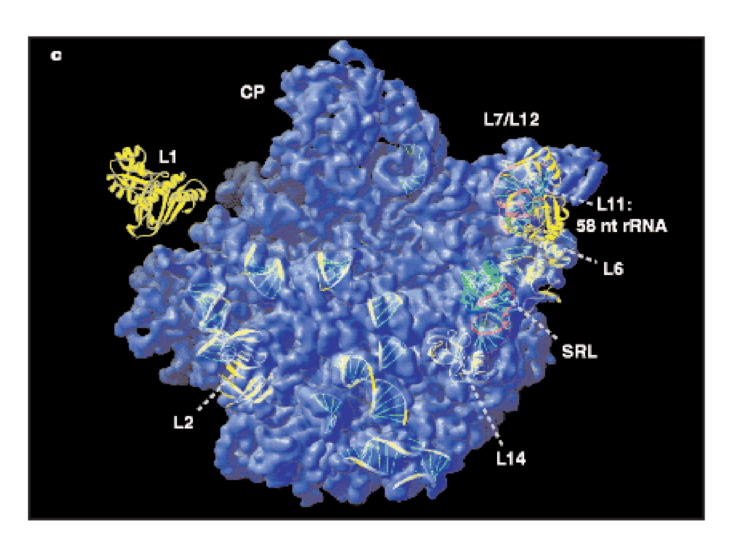


Figura 13-3. Mapa de densidad electrónica de la subunidad 50S a una resolución de 5 Å. Subunidad 50S vista de frente. Las letras L numeradas indican la posición de las proteínas ribosomales correspondientes. SRL corresponde a un asa de RNA (*sarcin-ricin loop*). Hacia el lado derecho está la zona del pentámero formado por las proteínas L-10 (no visible) y L7/L12. Tomado de: Ban y cols., 1999. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta foto a color.

(CP), así como la presencia de un asa de RNA (SRL) que proviene del 23S RNA y que marca la zona del centro reactivo del ribosoma (Ban y cols., 1999) (figura 13-3).

Centro de reacción del ribosoma

La localización topográfica de algunos sitios específicos en la estructura del ribosoma ha sido determinada por diferentes métodos. Los estudios de protección por ligandos y enlaces por entrecruzamiento han sido los que han permitido con más éxito el mapeo del ribosoma. Así, con aplicación de anticuerpos específicos se han localizado los sitios funcionales del ribosoma y los de unión a los factores de traducción. Los sitios de unión de dos de los factores principales de iniciación han sido determinados por estos métodos y confirmados por cristalografía. El sitio de unión del factor eIF-3, el cual previene la asociación de las dos subunidades, ha sido localizado en la parte trasera de la partícula (McCutcheon y cols., 1999).

En la subunidad 50S se lleva a cabo la función de peptidil transferasa.

Análisis de la subunidad 50S por metodologías de cristalografía con rayos X y densidad electrónica han facilitado la identificación y la localización de la hendidura ancha que forma la entrada al sitio activo del ribosoma, donde se lleva a cabo la función de peptidil transferasa (PT) y se encuentra el asa de RNA (SRL) ya mencionada (Nissen y cols., 2000) (figura 13-4a).

Sitios de unión del tRNA

Los primeros sitios identificados en el ribosoma fueron los de unión del tRNA. Existen dos sitios principales de unión entre el tRNA y el ribosoma, los sitios A y P en el centro de la peptidil transferasa. El sitio P corresponde a la posición del tRNA de iniciación (tRNAi), unido a la metionina correspon-

diente durante el inicio de la síntesis de proteínas y, posteriormente, durante la elongación, al tRNA acilado al péptido naciente. El sitio A corresponde al tRNA que lleva el nuevo aminoácido que va a agregarse a la cadena peptídica en crecimiento.

Las dos moléculas de tRNA y la del mRNA que va a ser decodificado forman una zona interconectada como una unidad topológica, cerca de donde se encuentra el centro activo del ribosoma, al inicio del túnel que atraviesa a la subunidad 50S desde el sitio donde se lleva a cabo la catálisis del enlace peptídico (PT) hasta el extremo posterior, donde está la salida del péptido en formación (Nissen y cols., 2000) (figura 13-4b).

La existencia de un tercer sitio de unión del tRNA con el ribosoma (E) ha sido descrito por varios autores, y está implicado en la liberación del tRNA desacilado proveniente del sitio P, después de la translocación del ribosoma (Nissen y cols., 2000). El sitio E ha sido descrito tanto en ribosomas de procariontes como de eucariontes y se considera que está ocu-

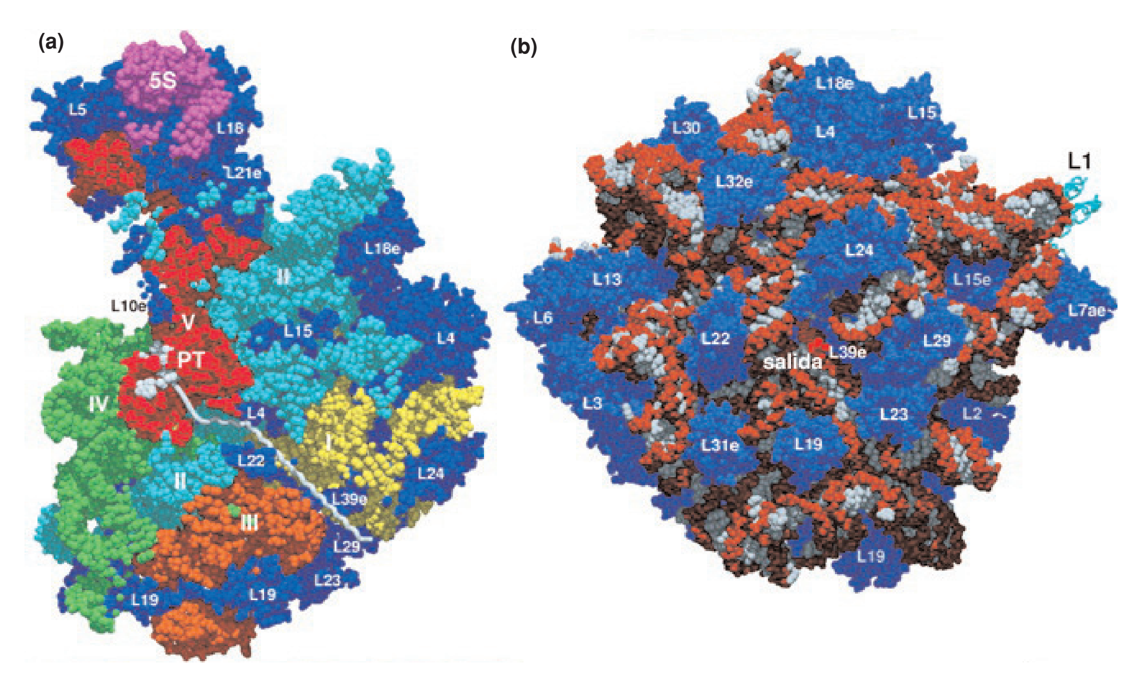


Figura 13-4. Centro de la peptidil transferasa y túnel de salida del péptido naciente.
a) Representación de un corte lateral de la subunidad 50S en un modelo que muestra el esqueleto de los átomos del RNA y las proteínas. Se observa la trayectoria del túnel (cordón blanco) que corre del centro de la peptidil transferasa (PT) al sitio de salida del péptido naciente (*salida*), en la parte posterior de la subunidad.
b) Vista de la parte basal de la subunidad 50S que muestra la posición de las proteínas ribosomales de esa área y, en la parte central, la salida del túnel (*salida*) por donde se desplaza el péptido naciente.
En ambas representaciones se ubica la posición de las proteínas que conforman a la subunidad 50S. Algunas de ellas (L4 y L22) parecen tener un papel importante en el tránsito del péptido naciente y su salida hacia el exterior.
Tomado de: Nissen y cols., 2000. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta foto a color.

pado por el tRNA que acaba de donar el péptido naciente al tRNA que lleva consigo el nuevo aminoácido para decodificar la siguiente tripleta en el mRNA. Se ha propuesto que existe un efecto alostérico entre los sitios E y A del ribosoma, de tal manera que se genera un efecto de cooperatividad negativa entre ambos, lo cual no permite la ocupación simultánea de estos dos sitios. De esta manera, el sitio E estaría ocupado solamente en el estado intermediario, transitorio, durante el movimiento de translocación del ribosoma, en el proceso de elongación (Semenkov y cols., 1996).

Dentro de este contexto se pueden considerar dos estados del ribosoma: 1) el de pretranslocación en que el tRNA desacilado está en el sitio P y el peptidil-tRNA en el sitio A, y 2) el de postranslocación en que el peptidil-tRNA ocupa el sitio P y el sitio A está vacío y disponible para recibir un nuevo aminoácido tRNA. En este modelo, la posición de los tRNAs quedan en el sitio y con la orientación adecuada para hacer contacto con el mRNA durante el proceso de decodificación. De tal forma que cuando el extremo 3' de los tRNAs están localizados en los sitios A y P, es decir, se encuentran en el centro de transferencia peptídica (PT), los dos anticodones respectivos están sobrepuestos a las dos tripletas correspondientes de la cadena del mRNA.

Complejo proteico pentamérico

Cerca del centro de reacción en la subunidad grande del ribosoma se localiza una de las regiones mejor caracterizada estructuralmente, llamada tallo lateral, el cual es flexible y está formado por un complejo proteico pentamérico. En procariontes, este complejo está formado por dos de cada una de las proteínas ribosomales ácidas L7 y L12 y una de L10 (figura 13-3) que se unen directamente al 23S rRNA entre las bases 1,000 y 1,200 de esta molécula. En eucariontes, el pentámero lo constituyen las llamadas proteínas ribosomales ácidas, de tipo P1 y P2 (Wool y cols., 1991). La masa molecular de estas proteínas fluctúa según el organismo de que se trate entre 12 y 16 kDa aproximadamente (Wool y cols., 1991; Ballesta y Remacha, 1996; Aguilar y cols., 1998). Unida a ellas se encuentra la proteína equivalente a L10, llamada la proteína P0, y todo el complejo se encuentra ubicado sobre la molécula del 28S rRNA. Esta región del ribosoma, tanto de procariontes como de eucariontes, incluye la zona del dominio de la GTPasa, que es precisamente donde se lleva a cabo la formación del enlace peptídico con la consecuente elongación del péptido naciente. A este mismo sitio se unen también los factores de elongación de la traducción, interaccionando con las proteínas ácidas del ribosoma (Agrawal y cols., 1998). Estos resultados indican que a pesar de que las proteínas del pentámero de eucariontes presenta diferencias en relación a sus contrapartes de eubacterias, la estructura que forman estas proteínas mantiene la misma localización en ambos tipos de ribosomas y realiza la misma función en la elongación del péptido naciente (Ballesta y cols., 1999; Ban y cols., 1999).



Biogénesis de los componentes del ribosoma

Moléculas precursoras del rRNA

Los genomas procariónticos o eucariónticos contienen copias múltiples de genes de rRNA. La combinación de un gran número de copias y promotores fuertes para los genes de rRNA es lo que le permite a las células mantener niveles elevados de ribosomas. En los eucariontes, estos genes están en el nucleolo formando racimos, y es ahí en donde se efectúa el procesamiento del rRNA y el ensamblaje de las proteínas ribosomales para generar a los ribosomas.

La formación de los rRNAs maduros se produce por procesamiento de los transcritos primarios de elevado peso molecular. Este proceso ha sido ampliamente estudiado tanto en bacterias como en eucariontes, y ocurre con la participación de múltiples enzimas, muchas de las cuales no han sido caracterizadas todavía a profundidad.

Los genes que codifican para los rRNAs son colinealmente transcritos dando lugar a moléculas de pre-rRNAs, las cuales son paso a paso procesadas para dar origen a las distintas moléculas maduras de rRNA. En eubacterias, este transcrito primario se conoce como RNA de 30S (5.5 kb) y contiene en forma ordenada secuencial las unidades de 16S, 23S y 5S, con zonas intermedias espaciadoras (figura 13-5a). En cada transcrito primario hay

Los genomas procariónticos o eucariónticos contienen copias múltiples de genes de rRNA.

En los eucariontes, estos genes están en el nucleolo formando racimos, y es ahí en donde se efectúa el procesamiento del *rRNA* y el ensamblaje de las proteínas ribosomales para generar a los ribosomas.

Los genes que codifican para los rRNAs son colinealmente transcritos dando lugar a moléculas de pre-rRNAs, las cuales son procesadas para dar origen a las distintas moléculas maduras de rRNA.

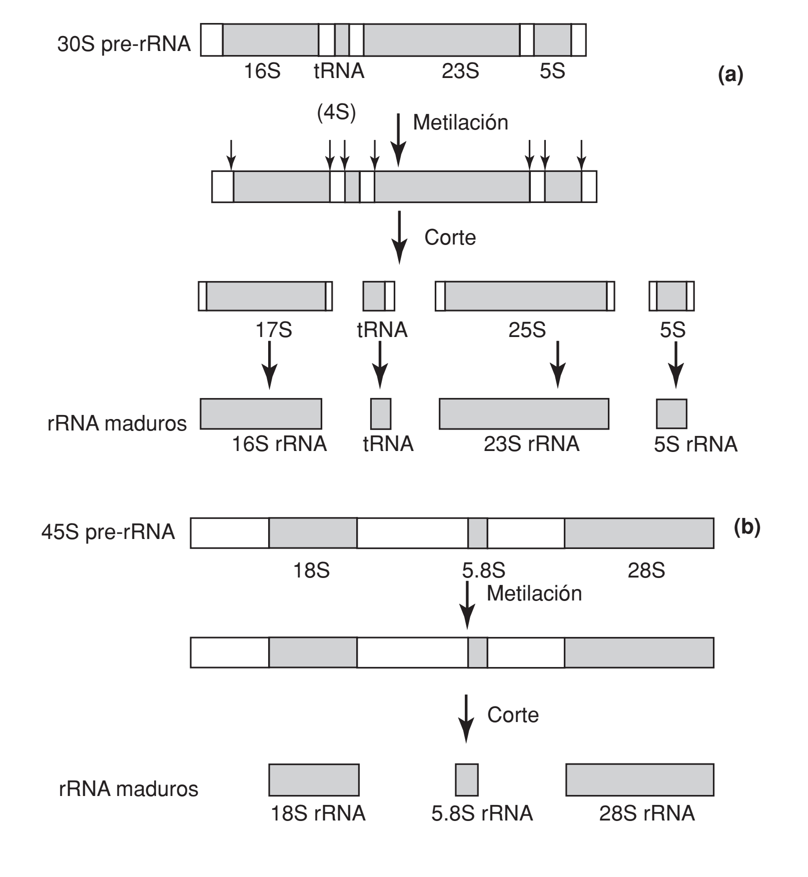


Figura 13-5. Esquema del procesamiento de los transcritos primarios de los rRNAs.
a) El transcrito del RNA precursor de eubacteria es una cadena de RNA que contiene los tres rRNAs: 5S, 16S, 23S y además uno o dos tRNAs. Por medio de metilaciones se señalan (↓) los sitios que van a ser cortados para producir intermediarios, los cuales finalmente se convierten en las tres moléculas maduras de rRNAs y tRNA.
b) RNA precursor de rRNAs de eucariontes. En estos organismos, el rRNA precursor contiene a los rRNAs: 5.8S, 18S y 28S y se procesa por señalizaciones semejantes a las que ocurren en eubacterias. El rRNA 5S se transcribe por otro proceso distinto al de los tres rRNAs mencionados.

también una zona intermedia entre los RNAs 16S y 23S que codifica para uno o dos tRNAs. El RNA precursor se procesa por efecto de una ribonucleasa (RNasa III) en sitios específicos marcados por metilaciones, produciendo productos pre-rRNAs primarios, los cuales finalmente dan lugar a los rRNAs maduros. Estas reacciones terminales se llevan a cabo por medio de enzimas denominadas madurasas, las cuales usan como sustratos a complejos formados de pre-rRNA y proteínas (RNP), en los que participan proteínas ribosomales llamadas de ensamblaje temprano.

En el caso de los ribosomas de eucariontes ocurre un proceso similar. A partir de una molécula de 45S (13 kb) que contiene las secuencias de 18S, 5.8S y 28S se forman precursores intermediarios que finalmente darán origen a las correspondientes moléculas maduras (figura 13-5b). Al contrario de lo que ocurre en eubacterias, en este caso los genes codificadores de la molécula de 5S rRNA se encuentran separados del resto de los genes de rRNA, y son transcritos por otra RNA polimerasa diferente de la que transcribe a los dos rRNAs mayores y al 5.8S rRNA.

Síntesis de las proteínas ribosomales

La existencia de diferentes patrones de organización para los genes de rRNAs en procariontes y eucariontes indica que ni la localización ni la cotranscripción acoplada de estos genes es indispensable para mantener la vida de la célula. Sin embargo, es evidente que debe existir una regulación acoplada entre la expresión de los genes de rRNA y los que codifican para las proteínas estructurales de los ribosomas, y de éstos entre sí mismos, a fin de lograr eficiente producción de ribosomas. A diferencia de los genes para los rRNAs, los que codifican para las proteínas ribosomales se encuentran en una o muy pocas copias en el genoma. Por tanto, los mecanismos que regulan su expresión son también diferentes.

La coordinación de la síntesis de las moléculas de proteínas ribosomales entre sí se logra a través de regulación tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. En procariontes uno de los mecanismos más conocido es el de la retroinhibición ejercida por algunas de las proteínas ribosomales, que al estar en exceso se unen a su propio mRNA o al de otra proteína ribosomal e impiden su traducción, de tal manera que regulan así su propia concentración en las células. En eucariontes, el mecanismo es diferente aunque la síntesis de las proteínas ribosomales también se regula a nivel traduccional. Los mRNAs que codifican para las proteínas ribosomales (premRNA) de eucariontes contienen una secuencia peculiar de nucleótidos, rica en pirimidinas, en la zona 5' no traducible de sus mensajes (zona 5'UTR). Alteraciones en esta secuencia bloquean la coordinación en la síntesis de las proteínas ribosomales. Por otra parte, se ha encontrado en organismos superiores que la fosforilación de la proteína ribosomal S6 es parte del mecanismo de reconocimiento de esta señal en la zona 5' UTR de los pre-mRNAs. Actualmente no se conoce con precisión cómo interactúan estas dos señales para lograr la regulación de la traducción. Sin embargo, investigaciones en proceso probablemente proporcionen su esclarecimiento en un futuro próximo (Sonenberg y cols., 2000).

Funcionamiento de los ribosomas

La función fundamental de los ribosomas en las células de todos los organismos es la síntesis de proteínas. El proceso consta de una serie de reacciones perfectamente coordinadas, que en su conjunto constituyen el llamado proceso de traducción o de decodificación de mRNAs y que da por resultado la síntesis de nuevas proteínas.

La función fundamental de los ribosomas en las células de todos los organismos es la síntesis de proteínas.

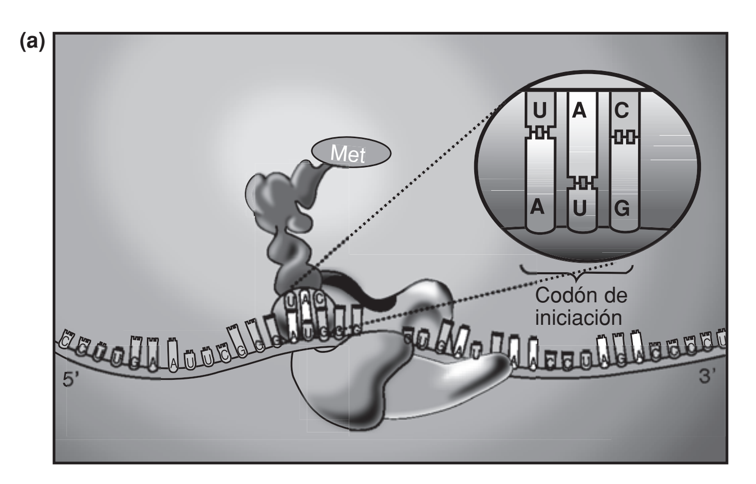
A pesar de que todavía muchos aspectos del proceso de la síntesis de proteínas se desconocen en detalle, actualmente se considera que las múltiples y complejas reacciones que se llevan a cabo en el ribosoma, son de hecho el resultado de la interacción en forma concertada de las moléculas de RNA y de las proteínas que constituyen en su conjunto el aparato traductor.

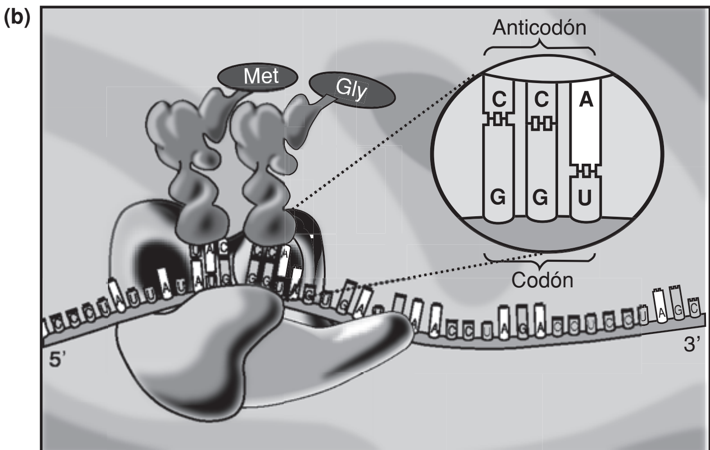
Proceso de traducción o síntesis de proteínas

Existen diferencias importantes entre los mecanismos que regulan la síntesis de proteínas en procariontes y eucariontes, ya que en el primer caso la traducción se lleva a cabo en el complejo DNA-RNA, simultáneamente al proceso de transcripción, mientras que, en eucariontes, la estructura nuclear separa temporal y físicamente estas dos funciones y, por tanto, el mRNA debe viajar al citoplasma para llevar a cabo su traducción. Sin embargo, en ambos casos, en el proceso de síntesis de proteínas se distinguen tres etapas fundamentales:

En el proceso de síntesis de proteínas se distinguen tres etapas fundamentales: iniciación, alargamiento y terminación.

1. La etapa de iniciación, que comprende las reacciones que conducen a la formación del complejo de iniciación, consistente de la subunidad ribosómica 30S o 40S, la matriz de mRNA que va a ser traducida, el tRNA iniciador cargado con metionina y varias proteínas accesorias que se llaman factores de iniciación (figura 13-6a). En esta etapa de formación del complejo de iniciación es donde existen más diferencias entre el proceso en eubacterias y eucariontes, siendo más complejo este último. Además, es aquí donde confluyen varios mecanismos de control de la traducción que tienen por objeto asegurar que se seleccione el codón apropiado de iniciación (AUG) y el marco de lectura para la formación de la proteína correspondiente. Cuando el complejo de iniciación está ya formado con la subunidad pequeña del ribosoma, se une a este complejo la subunidad grande y con ello queda lista la maquinaria para continuar el proceso.
2. En la etapa siguiente se lleva a cabo el alargamiento de la cadena polipeptídica que es direccional. Los ribosomas y los componentes asociados a ellos se mueven sobre el mRNA en la dirección 5'→ 3' de esta molécula y la nueva proteína se sintetiza del extremo N-terminal hacia el –COOH terminal de la cadena peptídica. Este proceso se efectúa en un microciclo de tres etapas que se repite a lo largo del mRNA. En esta forma se van traduciendo uno a uno los codones respectivos que forman el marco de lectura en el mRNA. Para este efecto, las moléculas de aminoacil tRNA van ocupando consecutivamen-





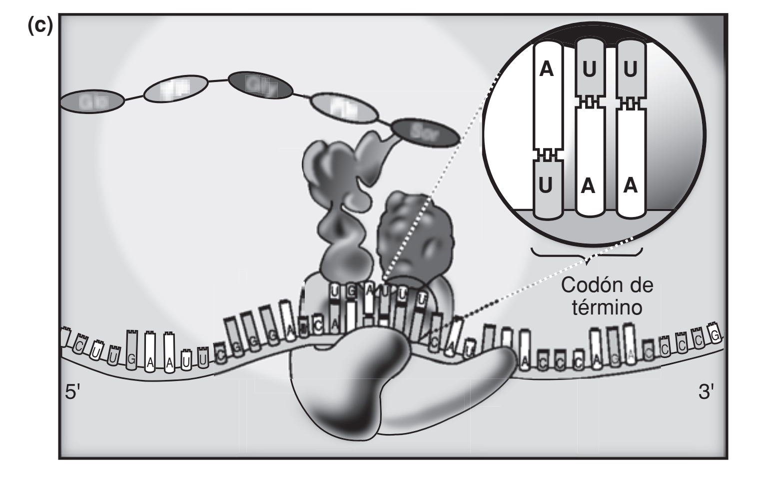


Figura 13-6. Esquema que ilustra el proceso de síntesis de una cadena peptídica. **a)** Iniciación. El primer tRNAi-met (anticodón UAC) se posiciona en el sitio P apareado sobre la tripleta de iniciación AUG en el mRNA que se encuentra unido a la subunidad 30S. A este complejo, llamado de iniciación, se le une la subunidad 50S formando el complejo activado 70S.
b) Alargamiento. El siguiente acil-tRNA se coloca en el sitio A sobre su tripleta correspondiente y se une por enlace peptídico a la metionina, el primer aminoácido. El ribosoma se transloca y el tRNAi se libera. Este ciclo de elongación se repite a lo largo de todas las tripletas del mRNA.
c) Terminación. El proceso se detiene al llegar a la tripleta de terminación en el mRNA, la cual es reconocida por los factores de término. El péptido formado se libera y se desensambla el ribosoma. Tomado de: www.worthpublishers.com/lehninger.

te el sitio A y el sitio P del ribosoma y liberándose en el sitio E, a medida que procede la traslocación del ribosoma, el deslizamiento del mRNA y la formación del enlace peptídico (figura 13-6b).

3. Finalmente, la etapa de terminación corresponde al momento en que el complejo de traducción llega a un codón de término (codón

sin sentido). En esta posición se desensambla este complejo ayudado por factores de terminación y se libera la proteína sintetizada. Las dos subunidades del ribosoma se separan y pueden participar en un nuevo ciclo del proceso (figura 13-6c).

Formación de polisomas

Cuando los ribosomas se encuentran sintetizando activamente proteínas, forman estructuras multiméricas denominadas polisomas (o polirribosomas). Estas estructuras están unidas entre sí por la molécula de mRNA, en donde se encuentran simultáneamente engarzados varios ribosomas, distribuidos a distancias definidas entre sí.

Los polisomas son, por tanto, estructuras comunes en las células vivas. Experimentalmente, es posible separar por ultracentrifugación a los polisomas de los ribosomas (monosomas) que no están participando en el proceso de traducción. De esta manera, se pueden aislar a los mRNAs que son traducidos en una etapa de la vida celular o de un tejido, pues sólo los mRNAs unidos a los polisomas están siendo traducidos en las células en un momento determinado, lo cual constituye la expresión genética efectiva de una célula dada y constituye lo que actualmente tiende a denominarse la proteómica de esa etapa celular.

Ciclo del ribosoma

Como se ha mencionado, la síntesis de las proteínas ocurre en el citoplasma celular. Sin embargo, los productos formados deben trasladarse a diferentes regiones o estructuras celulares. Es así que el destino final de las proteínas está controlado por ciertas señales que permiten dirigir las proteínas a los sitios respectivos donde van a desempeñar su función.

En particular, en las células eucariontes, hay una dinámica de redistribución de los ribosomas en el interior de las células, en donde unos ribosomas permanecen libres en el citoplasma y otros se movilizan para quedar como ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico. En estos últimos es en donde se lleva a cabo la síntesis de las proteínas que van a ser depositadas en el lumen del retículo endoplásmico (RE). La señal responsable de la identificación de los ribosomas para su unión con el RE depende del mRNA que se haya integrado al ribosoma. En efecto, en la etapa temprana de la traducción de estos mensajes, queda al descubierto la zona amino-terminal del péptido en formación, la cual contiene una secuencia-señal cuya longitud puede oscilar entre 13 y 36 residuos de aminoácidos. Esta señal, que se antecede de una región de 10 a 15 residuos de aminoácidos hidrofóbicos y algunos aminoácidos con carga positiva, es reconocida por una partícula ribonucleoproteica llamada SRP (partícula de reconocimiento de señales), constituida por una molécula de RNA (7S) y varias proteínas. La unión de estas estructuras forma un complejo que, a su vez, funciona como un adaptador capaz de acoplar la maquinaria de síntesis

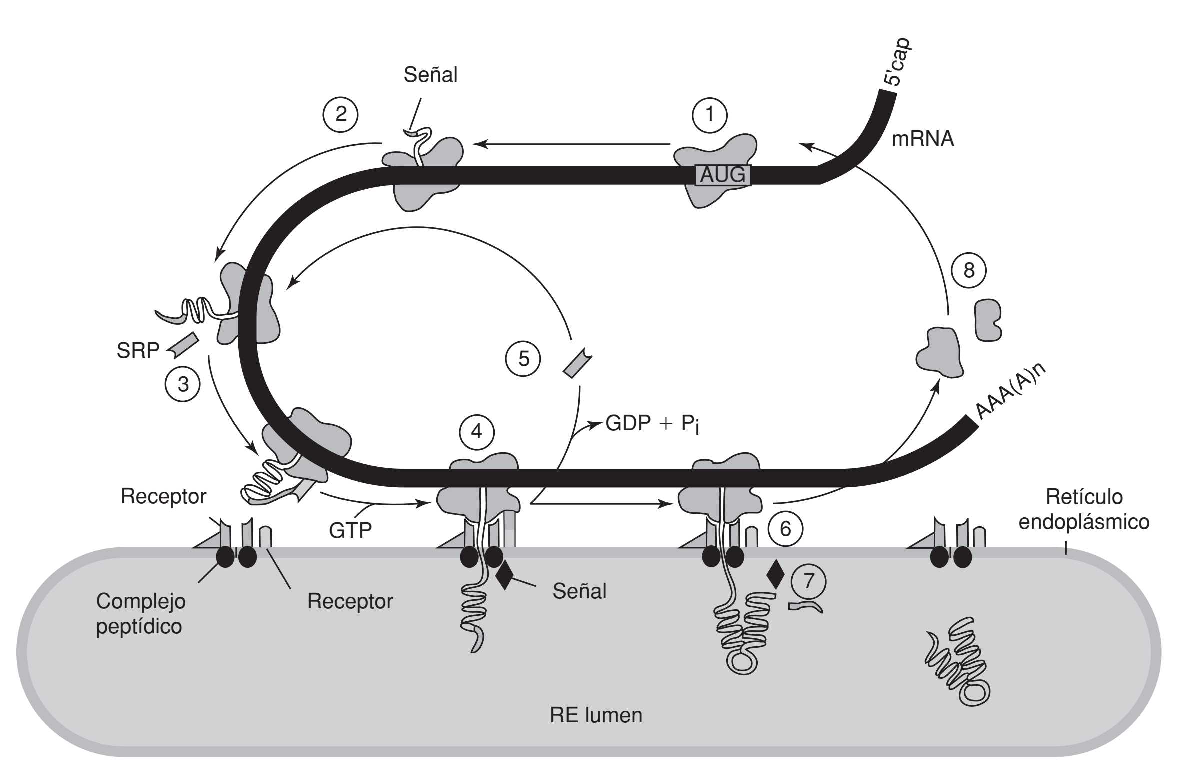


Figura 13-7. Ciclo del ribosoma.
La figura ilustra el proceso de síntesis de las proteínas que deben dirigirse al interior del retículo endoplásmico (RE lumen). Los números del 1 al 8 describen los pasos importantes del ciclo: 1) Inicio de la síntesis en la posición AUG. 2) Señal en el inicio de la cadena del péptido naciente. 3) Reconocimiento de la señal por la partícula SRP y su unión al ribosoma. 4) Anclaje del ribosoma en el receptor de la membrana del RE. 5) Desprendimiento de la partícula SRP. 6) Continuación de la traducción del mensaje que lleva el ribosoma. 7) Desprendimiento de la proteína ya terminada. 8) Separación de las dos subunidades del ribosoma para iniciar un nuevo ciclo.
Tomado de: Nelson y Cox, 2000.

proteica del citosol a la maquinaria de translocación de proteínas de la membrana del RE, ya que el complejo ribosoma-SRP es anclado en la membrana del RE a través de receptores membranales (figura 13-7). La partícula SRP es entonces liberada hacia el citosol, mientras que el ribosoma permanece unido a la membrana del RE hasta terminar la síntesis de la proteína correspondiente dirigida al interior del lumen del RE. Este proceso, que se ha descrito tanto para vertebrados como para células de plantas superiores, se conoce como el ciclo del ribosoma (Lütcke, 1995).



Recapitulación

Como corolario de este capítulo se desprenden varias consideraciones. En primer lugar, el reconocimiento de la universalidad del ribosoma como el organelo fundamental del aparato traductor en todas las células de los organismos vivos. En segundo, la gran conservación de la estructura de este

organelo a través de la evolución, especialmente en las partes básicas que sustentan su funcionalidad.

No obstante lo anterior, está también claro que existen diferencias estructurales importantes entre los ribosomas 70S y 80S. En efecto, los ribosomas 80S muestran cambios durante el proceso evolutivo, acordes con las características de los organismos eucariontes, en los que la adquisición de la estructura nuclear determinó la separación física y temporal de los procesos de transcripción y de traducción. Una de las características más interesantes en los ribosomas 80S la constituye la fosforilación de algunas de sus proteínas ribosomales: S6, P1, P2 y P0, modificación que no ocurre en los ribosomas 70S. La fosforilación de estas proteínas parece estar asociada a mecanismos de regulación traduccional, los cuales aparentemente podrían ser determinantes en las células de eucariontes para controlar la cantidad y el tipo de las proteínas que se requiriera sintetizar, de acuerdo con el estado fisiológico y/o de diferenciación o desarrollo en que se encuentre el organismo.

Es de esperarse que, dada la velocidad con que se está investigando en esta área del conocimiento, en un futuro próximo se podrán conocer con mayor profundidad algunos de los procesos regulatorios más importantes de la función del aparato traductor, los cuales actualmente empiezan a ser reconocidos.



Referencias generales

Garrett, R.A.; Douthwaite, S.R.; Liljas, A.; Matheson, A.T.; Moore, P.B. y Nöller, H.F., eds., *The Ribosome. Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions.* ASM Press, Washington, D.C. 2000.

Hill, W.E.; Dahlberg, A.; Garret, R.A.; Moore, P.B.; Schlessinger, D. y Warner, J.R., eds., *The Ribosome. Structure, Function and Evolution.* Am. Soc. for Microbiol. Washington, D.C. ISBN 1-55581-020-9, 1990.

Nierhaus, H.; Franceshi, F.; Subramanian, A.R.; Erdmann, V.A. y Wittmann-Liebold, B., eds., *The Translational Apparatus.* Cold Spring Harbor Press. Nueva York, EE.UU. ISBN 0-306-44538-7, 1992.

Nelson, D.L. y Cox, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry.* Third Edition. Worth Publishers, Nueva York, NY EE.UU. ISBN 1-57259-153-6, 2000. www.worthpublishers.com/lehninger.

Lewin, B., *Genes VII.* Oxford University Press. Oxford, Nueva York, Tokio. ISBN 0-19-879280-8, 2000.

Sonenberg, N.; Hershey, J.W.B. y Mathews, M., eds., *Translational Control of Gene Expression.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, USA. EE.UU. ISBN 0-87969-568-4, 2000.



Referencias bibliográficas

Agrawal, R.K.; Penczek, P.; Grassucci, R.A. y Frank, J., "Visualization of elongation factor G on the Escherichia coli 70S ribosome: the mechanism of translocation", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **95:** 6134-6138, 1998.

Aguilar, R.; Montoya, L. y Sánchez de Jiménez, E., "Synthesis and phosphorylation of maize acidic ribosomal proteins. Implications in translational regulation", *Plant Physiol.,* **116:** 379-385, 1998.

Ballesta, J.P.G.; Rodríguez-Gabriel, M.A.; Bon, G.; Briones, E.; Zambrano, R. y Remacha, M. "Phosphorylation of the yeast ribosomal stalk. Functional effects and enzymes involved in the process", *FEMS Microbiol. Reviews,* **23:** 537-550, 1999.

——— y Remacha, M., "The large ribosomal subunit stalk as a regulatory element of eukaryotic translational machinary", *Progr. in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol.,* **55:** 157-193, 1996.

Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Capel, M.; Moore, P.B. y Steitz, T.S., "Placement of protein and RNA structure into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit" *Nature,* **400:** 841-847, 1999.

Beckmann, R.; Bubeck, D.; Grassucci, R.; Penczek, P.; Verschoor, A.; Blobel, G. y Frank, J., "Aligment of conduits for the nascent poly peptide chain in the ribosome-Sec61 complex", *Science,* **278:** 2123-2128, 1997.

Clemons, W.M. Jr.; May, J.L.C.; Wimberly, B.T.; McCutcheon, J.P.; Capel, M.S. y Ramakrishnan, V., "Structure of a bacterial 30 Å resolution X-Ray crystallographic map of the large ribosomal subunit", *Nature,* **400:** 833-840, 1999.

Lake, J.A., "Evolving ribosome structure: Domains in archaebacteria, eubacteria, eocytes and eukaryotes", *Annu. Rev. Biochem.,* **54:** 507-530, 1985.

Lütcke, H., "Signal Recognition Particle (SRP) an ubiquitions initiatior of protein translocation", *Eur. J. Biochem.,* **228:** 531-550, 1995.

McCutcheon, J.P.; Agrawal, R.K.; Philips, S.M.; Grassucci, R.A.; Gerchman, S.E.; Clemons, W.M. Jr.; Ramakrishnan, V. y Frank, J., "Location of translational initiation factor IF3 on the small ribosomal subunit", *Biochemistry,* **96:** 4301-4306, 1999.

Nissen, P.; Hansen, J.; Capel, M.; Moore, P.B. y Steitz, T.S., "The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis", *Science,* **289:** 920-930, 2000.

Semenkov, Y.P.; Rodwina, M.V. y Wintermeyer, W., "The allosteric three-site model of elongation can not be confirmed in a well-defined ribosome system from Escherichia coli", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **93:** 12183-12188, 1996.

Wimberly, B.T.; Brodersen, D.E.; Clemons, W.M. Jr.; Morgan-Warren, R.J.; Carter, A.P.; Vonrhein, C.; Hartsch, T. y Ramakrishnan, V., "Structure of the 30 S ribosomal subunit", *Nature,* **407:** 327-339, 2000.

Wool, I.G.; Chan, Y.L.; Glück, A. y Sazuky, R., "The primary structure of rat ribosomal proteins P_0, P_1 and P_2 and a proposal for a uniform nomenclature mammalian and yeast ribosomal proteins", *Biochimie.,* **73:** 861-870, 1991.

CAPÍTULO 14

EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

Lourdes Teresa Agredano Moreno ■ María de Lourdes Segura Valdez
Guadalupe Trinidad Zavala Padilla ■ Luis Felipe Jiménez García

Introducción

El retículo endoplásmico (RE) es una subestructura presente en eucariontes, que provee a la célula de una gran superficie para la organización espacial de reacciones químicas y de síntesis de moléculas. En general, se le podría definir como el sitio de síntesis de proteínas, hormonas esteroides, fosfolípidos y ácidos grasos; así como encargado del secuestramiento y almacenamiento del Ca^{2+} intracelular y donde se llevan a cabo reacciones de desintoxicación de la célula (Lodish y cols., 2000; Smith y Wood, 1996; Alberts y cols., 2002).

Como se verá más adelante en forma más detallada, el Reticulo Endoplásmico Rugoso (RER) es particularmente abundante en células secretoras, ya que es el punto de entrada de la ruta de secreción donde las proteínas secretoras encuentran las maquinarias necesarias para el plegamiento, control de calidad y señalización, las cuales funcionan como todo un mecanismo integrado.

La ruta de las proteínas secretoras inicia con la inserción de una preproteína "señalizada" al lumen del RER. Ahí, algunas clases de proteínas son reclutadas por acarreadores de exportación, mientras que otras son exportadas como *bulk flow* cargo. El subsecuente transporte al aparato de Golgi es mediado por membranas tubulovesiculares (Brodsky, 1998; Lodish y cols., 2000; Chevet y cols., 2001; Parodi, 2000; Klumperman, 2000).

Parte del procesamiento postraduccional que sufren las proteínas en el lumen del RER como parte del proceso de plegamiento son la glicosilación y la sulfatación (formación de puentes disulfuro). En particular, es en el lumen del RR donde se lleva a cabo la *N*-glicosilación; en este proceso la formación de la glicoproteína depende parcialmente de la deglicosilación de un oligosacárido transferido de un derivado de dolicol difosfato. Los Trypanosomátidos son las únicas células de tipo "silvestre" que transfieren *in vivo* oligosacáridos no glicosilados en la *N*-glicosilación de proteínas. Estos parásitos carecen de la síntesis del dolicol-P-Glc, por lo que se ha sugerido que es otro azúcar el que debe ser el donador, y que probablemente sea un

UDP-Glc el involucrado en la reacción de glicosilación (Hirschberg y cols., 1998; Parodi, 1998; Parodi, 2000).

Actualmente se sabe que, como regla, sólo las proteínas que pasan un proceso de selección astringente son transportadas a los organelos o compartimentos de destino final. El control de calidad se lleva a cabo una vez que la preproteína es transferida a una maquinaria de translocación de multiproteínas en la membrana del RER donde se modifica para adquirir la estructura terciaria adecuada e incluso la cuaternaria. Sin embargo, cuando el plegamiento o cualquier otro procesamiento de maduración de la molécula, no es adecuado, es también el sitio de "control de calidad" donde se interrumpe el paso hacia el aparato de Golgi, y las proteínas erróneamente procesadas son enviadas al citoplasma y degradadas en proteosomas. El control de calidad mejora la eficiencia en el plegamiento y previene efectos peligrosos debidos a un plegamiento incorrecto o incompleto (Ellgaard y cols., 1999; Parodi, 2000; Chevet, 2001).

En eucariontes, la mayoría de las proteínas transportadas hacia el espacio extracelular son sintetizadas como polipéptidos precursores que contienen una señal en el extremo N-terminal o secuencias de señalización. Ahora se sabe que existe otro tipo de transporte de proteínas entre una y otra célula denominado *no clásico* en el que, proteínas que carecen de la secuencia del péptido señal, son exportadas por una vía independiente de la ruta clásica de RER-Golgi. Este mecanismo que aún es poco entendido se descubre y describe por primera vez para levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Es el caso de algunas proteínas que son factores de crecimiento como el FGF-1 y -2 (factor de crecimiento de fibroblastos-1 y -2) y la interleucina-1; así como la proteína Tat del virus de inmunodeficiencia humana-1 (HIV-1) (Muesch y cols., 1990; Cleves, 1997).

> En eucariontes, la mayoría de las proteínas transportadas hacia el espacio extracelular son sintetizadas como polipéptidos precursores que contienen una señal en el extremo N-terminal o secuencia de señalización.

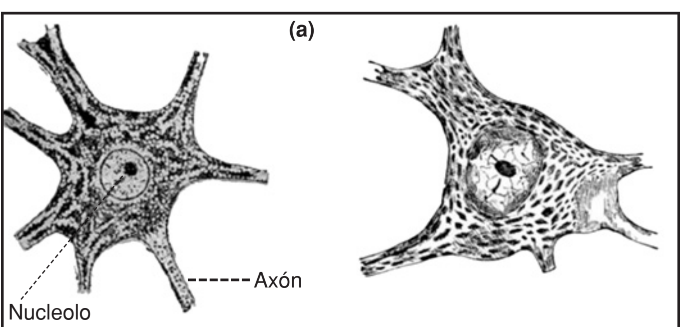
El RE en plantas, además de ser el puerto de entrada de las proteínas a un complejo sistema endomembranoso en el cual se iniciarán algunas de las modificaciones postraduccionales, está involucrado en la biosíntesis de lípidos y su almacenamiento. Además, posee algunas funciones adicionales que no se presentan en mamíferos y levaduras. Este compartimento subcelular está involucrado en la comunicación célula-célula, vía los plasmodesmata y, en células especializadas sirve como sitio de almacenamiento de proteínas (Galili y cols., 1998).

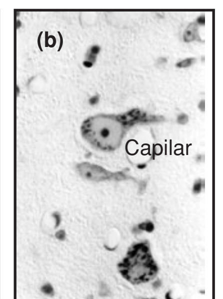


Antecedentes históricos

A finales del siglo XIX, el citólogo francés Garnier (Fawcett, 1981) describió una estructura filamentosa de naturaleza basofílica a la que llamó *ergastoplasma*. Las observaciones más interesantes de este autor son, por un lado, el hecho de que la presencia de esta estrucutura era fundamental en las células secretoras pues seguramente estaba involucrada en sus funciones sintéticas y, por otro lado, que este material variaba en forma y cantidad dependiendo de las diferentes fases del ciclo de secreción.

Al final del siglo XIX y principio del siglo XX los estudiosos del sistema nervioso daban por hecho la presencia de unas estructuras intracelulares,





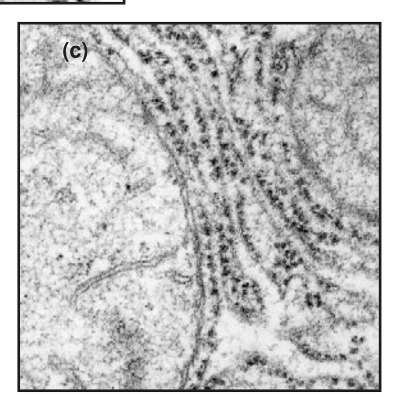


Figura 14-1. a) Imágenes de principios del siglo XX de neuronas motoras obtenidas de tejido nervioso teñido con la técnica de Nissl. Llama la atención la presencia de una estructura basofílica, citoplásmica, perinuclear (tomado de Wundt, 1902, Gray, 1918). **b)** Tejido nervioso (imagen actual) contrastado con la tinción de Nissl. Se observan fuertemente teñidos los cuerpos de Nissl en el cuerpo de la neurona y los nucleolos (tomado de Childs, 1998). **c)** Micrografía electrónica del retículo endoplásmico rugoso en donde se aprecian los ribosomas como partículas densas.

perinucleares, a las que denominaron *cuerpos* o *gránulos de Nissl,* a los cuales describieron como depósitos granulares cromofílicos, con aspecto tigroide. Estos cuerpos presentaban una relación peculiar a las diferentes formas y procesos celulares: se encontraban ensamblados en gran número en el punto de origen de la dendrita y estaban completamente ausentes en el axón (figura 14-1) (Wundt, 1902; Gray, 1918).

En 1945, con la llegada del microscopio electrónico como herramienta de investigación en biología, Albert Claude y Keith Porter, en su famosa micrografía electrónica de una célula intacta, presentada en *The Journal of Experimental Medicine*, ilustra un fibroblasto de embrión de ave de un cultivo fijado con tetraóxido de osmio, lavado y secado para prevenir la evaporación dentro de la cámara de vacío del microscopio electrónico. En ese trabajo titulado “A Study of Tissue Culture Cells by Electron Microscopy”, se lograron reconocer entre los organelos varias mitocondrias, el aparato de Golgi y un sistema reticular, al cual Porter dio el nombre de *retículo endoplásmico* el cual se presentaba como una vasta red de canales hechos de membrana. La red en este tipo celular se observa como una serie de círculos concéntricos, similar a los arillos de una rebanada de cebolla. Porter llamó a esta red retículo endoplásmico porque se encuentra más concentrado hacia el interior (endoplasma) que a la periferia de la célula (ectoplasma).

En 1955, a partir de observaciones hechas con el microscopio electrónico de transmisión, el grupo de Palade publica un artículo donde sugiere que tanto la sustancia basofílica de las células secretoras —o *ergastoplasma*— y la *sustancia Nissl* de las neuronas, son un material compuesto de retículo endoplásmico y finos gránulos, ambos revelados por microscopia electrónica (Sanford y cols., 1955). Ellos observan que el retículo se extiende por todo el citoplasma, pero es considerablemente más condensado en las áreas de los

La sustancia basofílica de las células secretoras —o *ergastoplasma*— y la *sustancia Nissl* de las neuronas, son un material compuesto de retículo endoplásmico y finos gránulos.

cuerpos de Nissl. Ahora se conoce que los "gránulos" electron-densos son los ribosomas que además de encontrarse libres en el citoplasma, están adosados a la superficie de la membrana del retículo endoplásmico (figura 14-1c).

En la actualidad, la estructura fina de este organelo celular se observa claramente definida con el microscopio electrónico. Utilizando cortes seriados de células con técnicas de reconstrucción tridimensional de imágenes se reconocen segmentos del retículo endoplásmico (RE), membranas dispuestas en paralelo entre otros elementos del citoplasma. La extensión varía en los diferentes tipos celulares, a tal grado que en las células especializadas con elevada actividad metabólica el RE se presenta densamente empaquetado (Alberts y cols., 2002).

El retículo endoplásmico presenta dos regiones claramente distinguibles tanto funcional como morfológicamente: el retículo endoplásmico liso (REL) y el retículo endoplásmico rugoso (RER).

El retículo endoplásmico presenta dos regiones claramente distinguibles tanto funcional como morfológicamente: el retículo endoplásmico liso (REL) y el retículo endoplásmico rugoso (RER). En ambos casos el RE consiste en un intrincado sistema de estructuras membranosas interconectadas entre sí. Más específicamente, el RER presenta una estructura que recuerda una serie de sacos aplanados mientras que el REL tiene una estructura tubular. La diferencia morfológica más evidente entre ambas regiones es la presencia de ribosomas sobre la superficie externa de la membrana del RER y su ausencia en el REL. Juntos se encuentran limitando un mismo espacio intracelular denominado *lumen*. La región intermedia o de transición entre el RER y el REL presenta una baja proporción de ribosomas y se relaciona con el empaquetamiento, en vesículas, de productos de membrana para el transporte hacia el aparato de Golgi (Smith y Wood, 1996; Lodish y cols., 2000; Karp, 1996; Alberts y cols., 2002).

Biogénesis

El proceso de ensamblaje de las subunidades del RE se ha observado experimentalmente, por ejemplo, en fibroblastos en cultivo (células 3T3) expuestos al ionóforo de calcio que produce una fragmentación del RE, efecto que simula el fenómeno que ocurre durante la mitosis y que es relativamente específico ya que parece no afectar a ningún otro organelo. El efecto del ionóforo de calcio en la formación de estas subestructuras fue evaluado en los cultivos mediante el análisis del patrón de fluorescencia específico utilizando antiendoplasmina como marcador del RE. Mediante técnicas de microscopia electrónica se confirmó la dispersión y el reensamblaje del RE después de la remoción del ionóforo una vez que las células fueron colocadas en medio normal. Con los resultados obtenidos se demuestra que el RE de células 3T3 en interfase puede ser disociado y reensamblado en pequeños fragmentos. Además, los iones de calcio juegan un papel importante ya que el reensamblado es dependiente de la presencia de niveles milimolares de calcio en el medio externo.

Con base en estudios realizados a mediados de la década de 1990 se asume que durante la mitosis, algunos organelos membranosos, como las mitocondrias, los lisosomas y los peroxisomas, permanecen aparentemente

intactos durante la mitosis y que, por el contrario, organelos como el RE y el aparato de Golgi se fragmentan durante la profase, formando un gran número de vesículas que se dispersan en el citoplasma. En telofase la célula retorna a su condición de interfase y, así como la envoltura nuclear se reforma, las vesículas que eran parte del RE y el aparato de Golgi, se fusionan con las vesículas de composición similar para reconstruir esta red de estructuras citoplásmicas membranosas (Karp, 1996).

En un estudio más reciente (Jesch y Linstedt, 1998) empleando inmunofluorescencia, velocidad y densidad de gradiente de fraccionamiento, se encontró, en células HeLa, que el aparato de Golgi y el RE permanecen independientes durante la mitosis.

Por otro lado y más recientemente, Terasaki (2000) utilizando microscopia confocal en *time-lapse* y *photo-bleaching* en embriones de erizo de mar, encontró resultados opuestos a lo publicado hasta ahora aún en los libros de texto. Los hallazgos encontrados con este modelo son: que mientras que el aparato de Golgi si se fragmenta, el RE experimenta una acumulación en los polos mitóticos que es dependiente de los microtúbulos y que el RE permanece continuo durante el ciclo celular. Con base en sus resultados Terasaki sugiere que, al parecer el RE puede vesicularse o bien permanecer continuo durante la división celular, y esto va a depender del tipo de célula de que se trate y de manera importante, de su estado de diferenciación.



El retículo endoplásmico liso

En la mayoría de las células, el retículo endoplásmico liso (REL), representa solamente una menor proporción del RE total, sin embargo, en algunas células especializadas ocupa grandes extensiones del citoplasma. El REL es un organelo pleomórfico que participa directamente en la biogénesis de membranas, una actividad fundamental que propicia el crecimiento y desarrollo normal de las células y facilita la recuperación de áreas que degeneran por degradación. También participa en la síntesis de lípidos y en el almacenamiento de iones de calcio (Morré y cols., 1979). Entre sus funciones también destaca la participación en el metabolismo de los lípidos por contener las enzimas involucradas en su biosíntesis. En esta región también se lleva a cabo la producción y conversión del colesterol a diversas hormonas esteroides. En el REL de los hepatocitos, se modifica la solubilidad en agua de algunos productos tóxicos insolubles para excretarlos por vías urinarias. Otra función importante del REL es la captación del calcio. En algunas células representa un área altamente especializada, como sucede con el retículo sarcoplásmico en el caso de las células musculares (Alberts y cols., 2002).

> El REL es un organelo pleomórfico que participa directamente en la biogénesis de membranas, en la síntesis de lípidos y en el almacenamiento de iones de calcio.

En varios de los procesos que se llevan a cabo en el REL, la familia de proteínas del citocromo p450 desempeña un papel muy importante ya que cataliza (entre otras reacciones): *a*) el metabolismo de drogas, contaminantes ambientales y otros xenobióticos, y *b*) la biosíntesis de hormonas esteroides. Las proteínas P450 tienen un peso molecular dentro del rango de 45 a 62 kDa y presentan apenas 16% de identidad en la secuencia de aminoácidos; sin

> La familia de proteínas del citocromo p450 desempeña un papel muy importante ya que cataliza (entre otras reacciones): *a*) el metabolismo de drogas, contaminantes ambientales y otros xenobióticos y *b*) la biosíntesis de hormonas esteroides.

embargo, su estructura tridimensional es muy conservada. Esta familia comprende aproximadamente 1,000 genes para las diferentes P450 que se han clonado a la fecha. Sus secuencias conservadas y su localización son consideradas características que se utilizan para la deducción de los genes, así como los criterios bioquímicos para las actividades dependientes de P450, tales como:

- Dependencia de O_2.
- Dependencia de NADPH.
- Inhibición por monóxido de carbono y reversión por la acción de la luz.
- Inhibición por anticuerpos dirigidos contra reductasas P450.
- Localización en retículo endoplásmico.
  (Hasler y cols*.,* 1999; Werch-Reichart y cols*.,* 2000).

Síntesis de lípidos y reciclamiento de membranas

Formación de cuerpos lipídicos

La mayoría de los organismos almacena lípidos como parte de su ciclo de vida y como parte integral de los procesos para el almacenamiento y/o transporte de energía. Este almacenamiento conduce a la formación de cuerpos lipídicos, los cuales también provienen de microdominios del RE (o de la membrana plasmática en procariontes) que contienen las enzimas involucradas en la biosíntesis de lípidos (Galili y cols., 1998; Murphy y Vance, 1999).

El tamaño y estructura de los cuerpos lipídicos varía de organismo a organismo y depende de los componentes proteicos específicos, sin embargo, los mecanismos por los cuales estas estructuras se generan comparten características comunes: *a*) el principal y quizá único sitio (excepto en procariontes) de ensamblado de cuerpos lipídicos está en regiones especializadas del RE, donde como ya se mencionó, se agrupan funcionalmente las enzimas biosintéticas. Así también *b*), la mayoría de los cuerpos lipídicos se acumulan mediante proteínas de superficie específicas que se encuentran en el RE (tabla 14-1).

Durante la biogénesis, los pequeños cuerpos lipídicos nacientes sufren una serie de fusiones altamente reguladas y pueden alterar sus proteínas de superficie antes de alcanzar su tamaño y composición madura. Los cuerpos lipídicos que están dirigidos hacia el citosol pueden tener una ruta preestablecida mientras que los que se dirigen hacia el lumen del RE requieren de la cotraducción de proteínas específicas, tales como la apoliproteína B, y posiblemente de la participación de "chaperonas" (Murphy y Vance, 1999).

Siendo el REL el sitio principal de síntesis de lípidos, se encuentra muy desarrollado en células que producen grandes cantidades de estas moléculas, como el hígado, la glándula mamaria activa y las células intestinales (Smith y Wood, 1996).

Tabla 14-1. Formación de cuerpos lipídicos en diferentes tipos celulares. Tomada de Murphy y Vance, 1999.

Tejido-tipo celular	Sitio de formación	Dirección	Principales proteínas asociadas
PLANTAS			
Semillas y frutos	RE	Citosol	Oleosina[a]
Antera - polen	RE	Citosol	Ninguna
Antera - tapetum	RE	Liberación vía lisis	Oleosina-like
Plástidos	Membrana	Estroma	Fibrilina/PLP
ANIMALES			
Hígado-hepatocitos	RE	Secreción vía RE-Golgi	Apoliproteína
Intestino-enterocitos		Citosol	
Adiposo-adipocitos	RE	Citosol	Perilipina/ADRP
Adrenal, testículo, ovario (esteroidogénico)	RE		Perilipina/ADRP
Mamario-epitelio	RE?	Secreción vía exocitosis	(i) ADRP (ii) Butirofilina[b]
Otros - por ejemplo. leucocitos	RE?	Citosol	ADRP?
MICROORGANISMOS			
Levaduras	RE	Citosol	?
Procariontes acumuladores de Polhidroxialkanoatos	Membrana plasmática	Citosol	Fasina
Streptomyces spp.	Membrana plasmática	Citosol	?

[a]Sólo en semillas que se secan.
[b]Asociada más con la bicapa envolvente de la membrana que con el cuerpo lipídico en sí.
ADRP = Proteína relacionada con la diferenciación de adipocitos.
PLP = Proteína asociada a plástidos lipídicos.

En los pulmones de mamíferos, el surfactante, una compleja mezcla de lípidos (90%) y proteínas específicas (10%), previene el colapso alveolar y la transudación celular, gracias a que mantiene baja la tensión superficial de la interfase aire-líquido. Los fosfolípidos que forman esta mezcla son producidos en el REL de las células alveolares tipo II (o neumocitos tipo II) y se almacena en cuerpos membranosos característicos denominados cuerpos lamelares (Batenburg, 1992).

Por todo lo anterior, existe un considerable interés biotecnológico en la manipulación y almacenamiento de lípidos tanto desde el punto de vista médico como agronómico. Por ejemplo, en humanos, en varias enfermedades serias como obesidad, ateroesclereosis y diabetes tipo 2, está involucrada una disfunción en el almacenamiento de los lípidos neutros. Desde el punto de vista agronómico, el interés está basado en la producción de plantas que producen frutos o semillas con alto contenido lipídico (Murphy y Vance, 1999).

Biogénesis de membranas

En los procesos de reciclamiento de membranas, el REL juega un papel muy importante puesto que es el sitio de síntesis de fosfolípidos de membrana que provienen del interior del RE para reemplazar la envoltura nuclear como parte del reciclamiento de membranas del aparato de Golgi o para

formar nuevos lisosomas y mitocondrias, incluso para reemplazar la membrana del RE en sí.

La biogénesis de endomembranas requiere de la síntesis y ensamblado de 2 capas de fosfolípidos, glicolípidos y colesterol, además de la inserción de proteínas de membrana. El colesterol está presente en las células eucariontes pero se encuentra distribuido de diferente manera, mientras que la membrana del RE es pobre en colesterol, la membrana plasmática y en particular las capas de mielina están enriquecidas con este lípido (Berciano y cols., 2000).

Los fosfolípidos involucrados en la estructura de la membrana son sintetizados en el REL.

Como ya se mencionó, los fosfolípidos involucrados en la estructura de la membrana también son sintetizados en el REL. Las cadenas acil anclan a la molécula de lípido incompleta a la membrana, mientras que se van añadiendo las cabezas polares para completar el fosfolípido. Esto se lleva a cabo en el lado citosólico de la membrana del REL (figura 14-2, modificada de Smith y Wood, 1996).

Existe un mecanismo para transferir algunos de los fosfolípidos generados en la cara citosólica a la cara interna de la membrana del REL; este mecanismo es llamado movimiento de moléculas por *flip-flop*. Este movimiento se lleva a cabo gracias a la actividad de una enzima denominada flipasa que es capaz de catalizar la transferencia de algunos fosfolípidos a través de la bicapa hasta 10^5 veces más rápido de lo que normalmente sería posible. En general, este mecanismo se presenta en gran extensión porque termodinámicamente sería desfavorable; sin embargo, gracias a la presencia de esta translocasa ultrarrápida que no requiere energía, este proceso se realiza en varios puntos de la membrana del RE. La flipasa muestra una preferencia por fosfolípidos que contienen colina más que los que contienen etanolamina, serina o inositol, de manera tal que se produce una membrana con una distribución asimétrica de los fosfolípidos en cada una de las capas (Smith y Wood, 1996; Van Meer, 2000).

Durante el tráfico entre membranas del RE y el aparato de Golgi, los túbulos se extienden y "geman" en los extremos terminales de un organelo

A. acil transferasa; B. fosfatidato fosfatasa;
C. CDP-etanolamina diacilglicerol fosfatoetanolamina transferasa

Figura 14-2. Biosíntesis de fosfatidilcolina, también llamada lecitina, la cual se lleva a cabo en tres pasos. Cada paso es catalizado por enzimas que se encuentran en la membrana del REL, con sus sitios activos hacia el citoplasma.

para formar vesículas intermediarias de transporte que eventualmente se fusionan al organelo destinatario para dirigir su contenido o la misma porción de nueva membrana hacia su destino final. De esta manera, la extensión y formación de membrana es fundamentalmente importante para la función de estos organelos. Waterman-Storer y Salmon (1998) utilizaron la técnica de microscopia de epifluorescencia de "lapsos de tiempo con longitud de onda múltiple (*multi-wave length time lapse*)" para poder visualizar y determinar los mecanismos que llevan a la remodelación de la membrana del RE en células vivas. Ellos encontraron que la motilidad del RE dependiente de microtúbulos es fundamental para la estructura y función del RE y que los túbulos se extienden sólo en un microtúbulo en dirección del extremo *plus* hacia la periferia de la célula.

Desintoxicación

> En algunos órganos como el hígado y el pulmón, por ejemplo, el REL es también la subestructura celular involucrada en la desintoxicación de drogas, alcohol, barbitúricos y otros xenobióticos potencialmente peligrosos.

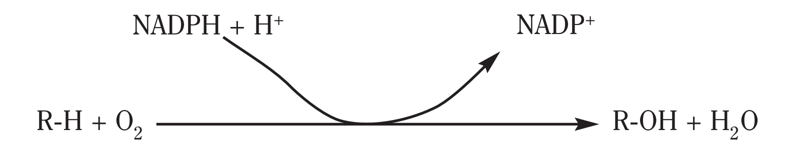
En algunos órganos como el hígado y el pulmón, por ejemplo, el REL es también la subestructura celular involucrada en la desintoxicación de drogas, alcohol, barbitúricos y otros xenobióticos potencialmente peligrosos. Cuando grandes cantidades de compuestos tóxicos están en circulación, se observa un gran incremento del REL, pero una vez que la droga ha sido eliminada del sistema, el REL adicional involuciona a corto plazo, como resultado de la actividad de los lisosomas.

El proceso de desintoxicación es un proceso que se lleva a cabo en dos etapas: la primera incluye oxidación, reducción, hidratación, hidrólisis, isomerización y otras reacciones específicas. En general, los productos de reacción de la fase I son químicamente más reactivos que el compuesto original, y al parecer, esta fase tiene como objetivo la creación de especies reactivas más que el verdadero proceso de desintoxicación, el cual se da en la fase II.

En la segunda fase se lleva a cabo una reacción de glucoronidación, en la cual un azúcar del UDP-ácido glucorónico es unido covalentemente al xenobiótico o endobiótico, facilitando así su eliminación mediante la orina o la bilis. La excreción directa de los gluguronoides del lumen del RE al citoplasma y al exterior de la célula, es un importante proceso regulado (Quizzine y cols., 1999).

Las reacciones de conversión de estos compuestos a compuestos menos peligrosos son catalizadas por oxidasas —que incluyen la p450— localizadas en la membrana del REL. Estas enzimas que, interesantemente carecen de un sustrato específico, son capaces de oxidar miles de compuestos hidrofóbicos convirtiéndolos en hidrofílicos (Smith y Wood, 1996; Karp, 1996; Alberts y cols., 2002).

La reacción general, por la que se lleva a cabo esta conversión es:



El grupo hidroxil recién formado es usualmente modificado por conjugación con una unidad cargada, tal como el sulfato o glucuronato.

El efecto neto de estas reacciones es el de incrementar la solubilidad de estos compuestos en agua, permitiendo que puedan ser transportados al riñón y excretados en la orina (Smith y Wood, 1996).

Síntesis de hormonas esteroides en células endocrinas y de la corteza adrenal

Las enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides a partir del colesterol también se encuentran en la membrana del REL.

Las enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides a partir del colesterol también se encuentran en la membrana del REL (Smith y Wood, 1996). Así, las tipos celulares que presentan un REL altamente desarrollado son los de las glándulas endocrinas y las células de Leydig. Ambos tipos celulares responden a un estímulo hormonal sintetizando hormonas esteroides (Karp, 1996).

La enzima que cataliza los primeros pasos de la síntesis de esteroides —que corresponde a la conversión de colesterol a pregnenolona— es la enzima que corta la cadena lateral del colesterol (Cholesterol Side-Chain Enzime, SCC). Éste es un complejo enzimático que está compuesto de tres subcomponentes: citocromo P450 de SCC (P450scc), adrenodoxina y adrenodoxin-reductasa; la P450scc funciona como la oxidasa terminal, mientras que la adrenodoxina y la adrenodoxin-reductasa sirven como proteínas genéricas transportadoras de electrones. Por medio de inmunohistoquímica, inmunocitoquímica ultraestructural e hibridación *in situ*, se han llevado a cabo ensayos para determinar el tipo celular que expresa los genes de las enzimas involucradas en la esteroidogénesis, así como los organelos involucrados. Con estos estudios se ha podido detectar que la conversión de colesterol a prognenolona y los pasos finales de la síntesis de corticoides ocurre en la mitocondria, mientras que los pasos intermedios, que dirigen la sínteis de deoxicorticosterona o deoxicortisol a partir de pregnenolona, toman lugar en las membranas del REL (Ishimura y Fujita, 1997; Ishimura, 1998).

Secuestramiento del calcio

El calcio activa la contracción muscular y es un segundo mensajero de hormonas de crecimiento que regulan el metabolismo y la expresión de genes (Smith y Wood, 1996).

El retículo endoplásmico liso de células musculares se encuentra altamente especializado, desempeña un papel preponderante en el ciclo de contracción-relajación muscular y recibe el nombre de retículo sarcoplásmico.

En particular, las células musculares responden a una variedad de estímulos por la movilización del ion Ca^{2+} (Alberts y cols., 2002). El retículo endoplásmico liso de células musculares se encuentra altamente especializado, desempeña un papel preponderante en el ciclo de contracción-relajación muscular y recibe el nombre de retículo sarcoplásmico (Aubier y Viires, 1998). Sin embargo, no sólo en estos tipos celulares se presenta esta especialización. En células neuronales coexisten el RER y el REL en los cuerpos celulares y en las regiones proximales de los exones,

pero en las terminales especializadas de las neuritas —que incluyen terminaciones de exones, conos de crecimiento y espinas— se observa principalmente REL.

En ambos casos (células muscular y nerviosa) se ha sugerido que la presencia de esta estructura membranosa tiene como función controlar los niveles de Ca^{2+} citoplásmico libre. Se ha podido determinar que existen varias proteínas en el REL que controlan el movimiento del Ca^{2+} a través de la membrana tanto en condiciones basales como en condiciones de respuesta a un estímulo ambiental (Mattson y cols*.,* 2000; Golovina y Blaustein, 1997; Khan y cols*.,* 2000).

El Ca^{2+} se acumula dentro del retículo endoplásmico a través de la función de una bomba, perteneciente a la familia de las ATPasas, dependiente de Ca^{2+}. En músculo estriado, por ejemplo, en condiciones de descanso, la concentración de Ca^{2+} en el REL es considerablemente más alta (10 a 100 μM) que en el citoplasma (100 a 300 nM). Con base en varios estudios se ha sugerido que este gradiente de Ca^{2+} se mantiene gracias a la presencia y actividad de la bomba de Ca^{2+}, dependiente de ATP, la **S**arco(**E**ndo)plásmica **R**etículo-**C**a^{2+}-**A**denosín trifosfatasa (SERCA ATPasa) en la membrana del REL, la cual secuestra Ca^{2+} y mantiene la relajación muscular (Aubier y Viires, 1998; Lompré, 1999; Furuya y cols*.*, 1994; Alberts y cols*.*, 2002).

El Ca^{2+} se acumula dentro del retículo endoplásmico a través de la función de una bomba, perteneciente a la familia de las ATPasas, dependiente de Ca^{2+}.

En el proceso de envejecimiento, se observa un decremento en la masa muscular, fuerza y velocidad de contracción del músculo esquelético. Estudios recientes, básicamente bioquímicos, aportan información acerca de los mecanismos patogénicos que subyacen a los cambios relacionados con el envejecimiento en relación al flujo de Ca^{2+} y el proceso de excitación-relajación. Hasta el momento, es claro que el número de bombas SERCA no se ve afectado por la edad y se sugiere que la patogénesis se debe a un decremento en la estabilidad conformacional de la bomba SERCA. La SERCA ATPasa es una proteína de vida larga que presenta una disminución en la tasa de recambio en el músculo envejecido, lo que estaría incrementando el potencial de modificaciones postraduccionales de la proteína. Esto, aunado a alteraciones debidas a cambios en la regulación dependiente de la fosforilación estaría contribuyendo al desacoplamiento del transporte de Ca^{2+} y la disminución en la respuesta de las células musculares (Margreth y cols*.*, 1999).

Existe una familia de genes para la SERCA: se trata de 3 genes llamados SERCA 1, 2 y 3, de los cuales hay dos isoformas para cada uno (figura 14-3).

El retículo endoplásmico rugoso

El retículo endoplásmico rugoso (RER) es particularmente abundante en las células secretoras y es el punto de entrada a la ruta de secreción donde las proteínas precursoras encuentran la maquinaria necesaria para su glicosilación, sulfatación, fosforilación y plegamiento. El RER juega un papel importante en la biosíntesis de proteínas. Sus membranas son el sitio de producción de todas las proteínas transmembranales y de secreción para la

El retículo endoplásmico rugoso (RER) es particularmente abundante en las células secretoras y es el punto de entrada a la ruta de secreción donde las proteínas precursoras encuentran la maquinaria necesaria para su glicosilación, sulfatación, fosforilación y plegamiento.

Gen	mRNA Maduro (por *splicing* alternativo)	Proteína
SERCA 1		*1a - Adulto músculo esquelético rápido*
		1b - Neonatal
SERCA 2		*2a - Músculos cardiaco, liso y esquelético lento*
		2b- Músculo liso ubicuo y no muscular
SERCA 3		*3a -*
		3b -

Figura 14-3. Familia de genes de la bomba SERCA y las isoformas de sus productos proteicos que resultan del *splicing* alternativo (modificado de Lompré, 1999).

mayoría de los organelos celulares incluyendo el RE, el aparato de Golgi, los lisosomas, endosomas, vesículas de secreción y la membrana plasmática. Las proteínas precursoras son dirigidas desde el citosol a la membrana del RER (*targeting*) e insertadas o transportadas a través de la membrana al lumen durante o inmediatamente después de su síntesis en el proceso conocido como *translocación*. Además el RER es también el sitio de “control de calidad” en donde las proteínas procesadas erróneamente son enviadas al citoplasma y degradadas en los proteosomas (Brodsky, 1998; Lodish y cols., 2000; Chevet y cols., 2001; Parodi, 2000).

Transporte de las proteínas precursoras desde el citosol a la membrana del RER: *Targeting*

Los elementos moleculares requeridos para dirigir una cadena polipeptídica (unida a un ribosoma) a la membrana del RER fueron identificados en la década de 1970 con ensayos *in vitro* y son: la partícula de reconocimiento de la señal (SRP), el receptor de la partícula de reconocimiento de la señal (SRPR, también conocido como proteína *docking*), GTP y una secuencia señal en la proteína naciente (SS).

La partícula de reconocimiento de la señal (SRP) de eucariontes es un complejo ribonucleoproteico soluble que comprende seis polipéptidos y un RNA de 300 nucleótidos.

Partícula de reconocimiento de la señal (SRP)

La **partícula de reconocimiento de la señal (SRP)** de eucariontes es un complejo ribonucleoproteico soluble que comprende seis polipéptidos y un RNA de 300 nucleótidos que dirige muchas proteínas secretoras y de

membrana al RER (Walter y Johnson, 1994). En mamíferos el transporte de prácticamente todas las proteínas a través de la membrana del RE requiere la actividad de la SRP (vía SRP-dependiente). Sin embargo, en las levaduras algunas proteínas son dirigidas a la vía secretora por mecanismos alternativos que no requieren la participación de la SRP (vía SRP-independiente) (Hann y Walter, 1991) y que utilizan chaperones moleculares para prevenir que las proteínas se plieguen de una forma inadecuada para la translocación (Chirico y cols., 1988; Deshaies y cols., 1988).

El **receptor de la partícula de reconocimiento de la señal (SRPR)** en mamíferos sólo se ha encontrado en la membrana del RE y es una proteína integral de membrana compuesta de las subunidades SRα y SRβ. Ambas subunidades son GTPasas. La subunidad α del receptor de la SRP necesita estar en su forma unida a GTP para que ocurra la interacción con la SRP y todavía no se conoce la función de la subunidad β en el proceso de translocación (Connolly, Gilmore y cols., 1993; Miller y cols., 1993).

La secuencia señal (SS)

La **secuencia señal (SS)** es una secuencia localizada en el extremo amino-terminal de las proteínas nacientes que contiene un núcleo de 8 a 30 aminoácidos hidrofóbicos y que se encuentra en prácticamente todas las proteínas que siguen la ruta secretora. La secuencia señal está involucrada en el reconocimiento de la proteína por el sistema de transporte unido a membrana y en una segunda etapa de reconocimiento en eventos tempranos del proceso de translocación.

La secuencia señal (SS) es una secuencia localizada en el extremo amino-terminal de las proteínas nacientes que contiene un núcleo de 8 a 30 aminoácidos hidrofóbicos y que se encuentra en prácticamente todas las proteínas que siguen la ruta secretora.

El proceso de *targeting* (figura 14-4) está regulado por tres GTPasas: la subunidad de 54K (SRP54) de la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) y las subunidades α y β del receptor de la partícula de reconocimien-

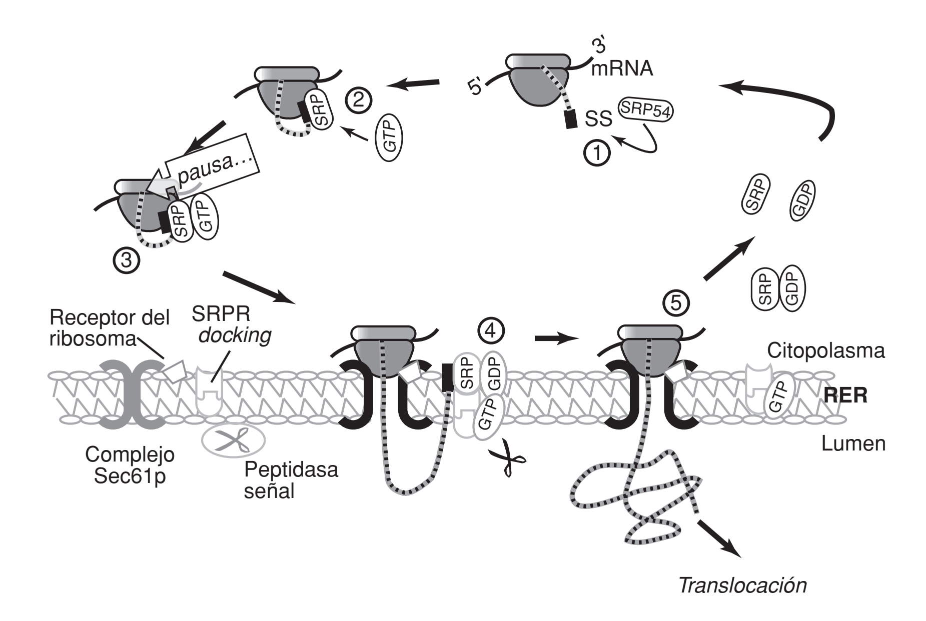


Figura 14-4. *Targeting* (modificada de Rapoport y cols., 1996).

to de la señal (SRPR). El proceso se inicia ① cuando la SRP interactúa en el citosol con la secuencia señal (SS) de la cadena polipeptídica naciente a través de SRP54. Mientras está unida a la secuencia señal, la SRP también interactúa directamente con el ribosoma y esta interacción incrementa la afinidad de SRP54 por GTP ② (Bacher y cols., 1996). La interacción causa que la SRP se una fuertemente al ribosoma el cual efectúa una pausa en la traducción ③ (arresto de la elongación de la cadena polipeptídica) lo cual permite que el ribosoma se una a la membrana del RER antes de que se complete la síntesis de la cadena polipeptídica evitando que la proteína sea liberada al citosol. El complejo formado por el ribosoma, la cadena naciente con su secuencia señal y la SRP (con GTP unido) se une a la membrana del RER. Esta unión involucra dos interacciones distintas, una entre la SRP y su receptor de membrana (proteína *docking*), y la otra entre el ribosoma y el complejo heterotrimérico Sec61p del "translocón" ④. La subunidad α del receptor de la SRP (SRα) necesita estar en su forma unida a GTP para que ocurra la interacción con la SRP. Posteriormente, la SRP es liberada ⑤ tanto de la secuencia señal como del ribosoma permitiendo que continúe la traducción . Finalmente, el ciclo de *targeting* se completa cuando el GTP es hidrolizado tanto en SRP54 como en SRα. Una vez liberada al citosol, la SRP puede comenzar un nuevo ciclo de *targeting*.

Una vez que la SRP ha dirigido el complejo cadena polipeptídica-ribosoma al sitio de translocación en el evento de *targeting*, los polipéptidos son transportados a través de la membrana en sitios específicos de translocación denominados "translocones" que son estructuras complejas que consisten de varias proteínas que forman un canal hidrofílico a través de la membrana por el cual se transporta la cadena polipeptídica naciente.

Antes del proceso de *targeting*, el translocón se encuentra en su configuración inactiva libre de ribosomas. El SRPR se encuentra localizado probablemente adyacente al "translocón", el poro del "translocón" tiene un diámetro pequeño y el extremo lumenal del poro esta sellado por un proceso dependiente de la proteína BiP (Hamman y cols., 1998).

Recientemente se ha propuesto que el complejo proteico NAC (complejo asociado a la cadena naciente) interviene en el evento de *targeting* aumentando su eficiencia (Wiedmann y cols., 1994), evitando la unión de la SRP a ribosomas que no tienen cadenas nacientes con secuencias señal expuestas. Por otra parte se ha propuesto que NAC sirve como inhibidor de la interacción SRP-independiente del ribosoma con la membrana del RER (Jungnickel y Rapoport, 1995). Por lo anterior se ha propuesto que el complejo NAC está involucrado en el evento de dirigir o transportar una proteína a la membrana del RER evitando el transporte indiscriminado de cadenas polipeptídicas a la membrana del RER.

Translocación de proteínas a través de la membrana de RER

La translocación de proteínas solubles a través de la membrana del RER y la integración de proteínas de membrana en el RER, constituye el primer

paso en el proceso de transporte de las proteínas que habrán de formar parte de otros organelos, de aquellas que serán depositadas extracelularmente o de aquellas que formarán parte de la membrana plasmática cuando sean proteínas constitutivas de la misma (Palade, 1975).

La translocación de proteínas al RER, se define como el proceso mediante el cual un polipéptido naciente se transporta a través de la bicapa lipídica hacia el lumen (en el caso de proteínas secretoras), o se inserta en la membrana (en el caso de proteínas integrales de membrana), en un evento que puede ocurrir **cotraduccionalmente** o **postraduccionalmente.**

Actualmente se conocen los componentes esenciales involucrados en la translocación de proteínas a través de la membrana del RER gracias al uso de sistemas libres de células en los cuales se introducen proteínas a microsomas rugosos con el propósito de identificar, purificar y estudiar los diversos componentes de la maquinaria molecular involucrada en el proceso de translocación proteica. Por lo anterior, las investigaciones se concentran en la elucidación del mecanismo molecular de este proceso.

Proteínas residentes del lumen del RER

Las proteínas que residen de manera permanente en el lumen del RER se distinguen de las proteínas secretoras por la presencia de la secuencia Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) en el extremo carboxilo-terminal (Munro y Pelham, 1987; Pelham, 1990). En la mayoría de las especies la secuencia predominante es KDEL, sin embargo, pueden presentarse variantes de esta señal en diferentes especies como se puede ver a continuación:

Señal	Especies en las que se localizan
KDEL	Vertebrados, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* y plantas
HDEL	*Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces lactis* y plantas
DEL	*Kluyveromyces lactis*
ADEL	*Schizosaccaromyces pombe*
SDEL	*Plasmodium falciparum*

Las proteínas con la señal KDEL son recuperadas de un compartimento post-RE por un receptor y regresadas a su localización normal. El mecanismo de reciclamiento para la retención de proteínas residentes tales como BiP se conoció cuando se fusionó la señal de retención KDEL al extremo carboxilo-terminal de la enzima lisosomal catepsina D observándose que ésta se acumuló en el RER y no sufrió las modificaciones típicas que ocurren en el complejo *cis*-Golgi (Pelham, 1990). Lo anterior sugirió la presencia de un receptor que se une a las señales de retención del RE en el complejo de Golgi y que dispara el transporte retrógrado al RE. El descubrimiento de tal receptor (ERD2 *ER-retention defective*) en levadu-

ras y posteriormente en su homólogo humano confirmaron esta hipótesis (Lewis y Pelham, 1992).

Translocación cotraduccional

En la translocación cotraduccional de proteínas, predominante en mamíferos, el transporte a través de la membrana del RER ocurre mientras la cadena polipeptídica está siendo sintetizada en los ribosomas unidos a la membrana del RER. El modo cotraduccional puede reproducirse experimentalmente con proteoliposomas reconstituidos que contengan el complejo proteico membranoso trimérico (el complejo Sec61p) y el receptor de la partícula de reconocimiento de la señal (SRP). Aunque estos tres componentes constituyen el aparato de translocación mínimo en la membrana, se requieren factores adicionales para estimular o regular el proceso.

Recientemente se ha mostrado, mediante el uso de proteoliposomas reconstituidos que la translocación de la mayoría de las proteínas secretoras de mamíferos requiere de la participación de la proteína de membrana asociada a la cadena de translocación (TRAM), la cual funciona de manera secuencia señal-dependiente (Voigt y cols., 1996) y del complejo Sec61. Estos dos elementos constituyen los principales componentes del canal de translocación o "translocón".

El "translocón" está formado por varias proteínas integrales de membrana que se asocian para formar un poro acuoso a través del cual pasan, desde el citoplasma hacia el lumen del retículo endoplásmico, las proteínas secretoras y los dominios lumenales de las proteínas de membrana. Los translocones no constituyen espacios "huecos" en la bicapa sino que son sitios muy dinámicos estructural y funcionalmente. Estudios recientes indican que el translocón es una máquina molecular que regula el movimiento de los polipéptidos a través de la bicapa, aparentemente en ambas direcciones así como lateralmente en la bicapa (Johnson y Van Waes, 1999).

Utilizando sondas flourescentes incorporadas a proteínas secretoras nacientes y experimentos de *quenching* en los que se usan agentes que apagan la flourescencia, se demostró que el poro acuoso a través del "translocón" tiene un diámetro de 40 a 60 Å durante la translocación cotraduccional de proteínas (Hamann y cols., 1997). Una vez que la translocación ha terminado la liberación de los ribosomas causa la "contracción" del "translocón", reduciéndose el diámetro de su poro de 40 a 60 Å a 9 a 15 Å (Hamman y cols., 1998).

El mecanismo molecular de la translocación cotraduccional y las funciones de los componentes del aparato de translocación todavía no están bien caracterizados. Sin embargo, experimentos realizados *in vitro* con sistemas reconstituidos han permitido detectar intermediarios de translocación en diferentes periodos de su transferencia a través de la membrana.

El transporte cotraduccional de proteínas a través de la membrana del RER se inicia en el citosol (figura 14-5), cuando la secuencia señal de una cadena polipeptídica creciente emerge del ribosoma que la está traduciendo y es reconocida por la SRP a través de su subunidad de 54 kD. El complejo

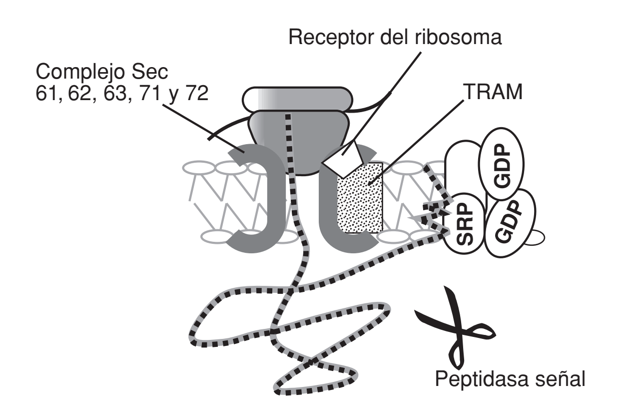


Figura 14-5. Translocación cotraduccional. La partícula de reconocimiento de la señal (SRP) se une a la secuencia señal (SS) de un polipéptido naciente produciéndose un arresto en la elongación de la cadena polipeptídica. Posteriormente SRP se une a su receptor (SRPR) en la membrana del RE. En el caso de las proteínas solubles, la SS se rompe de manera simultánea a la translocación por una peptidasa señal (*tijeras*). La mayoría de las proteínas de membrana tiene una secuencia señal que no es eliminada y que sale del translocón lateralmente hacia la bicapa lipídica para funcionar como una secuencia señal de anclaje.

formado por el ribosoma, la cadena polipeptídica naciente y la SRP se dirigen a la membrana vía dos interacciones. Una entre la SRP y el receptor de la SRP o proteína *docking* y la otra entre el ribosoma y el complejo Sec61p (Kalies y cols., 1994), que es un componente de membrana que forma el canal a través del cual los polipéptidos atraviesan la membrana.

Ocurre una transición de una interacción inicial débil a una interacción fuerte del complejo ribosoma-cadena naciente y el complejo Sec61p que requiere una secuencia señal funcional. En el primer paso, el ribosoma se une de manera débil al complejo Sec61p ya que en los intermediarios de translocación detectados en esta etapa, las cadenas nacientes son sensibles a la digestión con proteasas y pueden extraerse con concentraciones altas de sales (Jungnickel y Rapoport, 1995).

Experimentos de *crosslinking* muestran que en esta etapa la secuencia señal interactúa con la proteína de translocación de la cadena asociada a la membrana (TRAM). Una vez insertada en el canal, se inicia la translocación de la proteína naciente. Posteriormente, la unión entre el ribosoma y el complejo Sec61p es más fuerte ya que la cadena naciente no es sensible a proteasas ni a concentraciones altas de sales (Jungnickel y Rapoport, 1995).

La transición entre los dos modos de interacción del complejo ribosoma-cadena naciente con la membrana es un paso decisivo durante la translocación de proteínas. La unión fuerte del complejo ribosoma-Sec61p, el reconocimiento de la secuencia señal en la membrana y la apertura del canal son eventos simultáneos pero se desconocen los mecanismos moleculares por medio de los cuales ocurren estos pasos.

Hay evidencias recientes de que todos los pasos tempranos de la translocación de proteínas, incluyendo el paso decisivo durante el cual ocurre el reconocimiento de la secuencia señal, pueden reproducirse con los componentes de translocación purificados en una solución con detergentes, en ausencia de una bicapa lipídica (Mothes y cols., 1998).

Translocación postraduccional

La translocación postraduccional de proteínas es distinta de la translocación cotraduccional con respecto al mecanismo y a los componentes proteicos de membrana involucrados. El transporte postraduccional de proteínas se ha estudiado principalmente en *S. cerevisiae* para la proteína secretora prepro-α-factor. En éste, la cadena polipeptídica se sintetiza completamente en el citosol antes de ser translocada (figura 14-6) y puede reconstituirse con proteoliposomas reconstituidos que contengan el complejo transmembranal de siete proteínas del RER de levaduras llamado complejo Sec (Panzner y cols., 1995), en colaboración con la proteína lumenal Kar2p (BiP) y ATP (Vogel y cols., 1990; Sanders y cols., 1992; Brodsky y Schekman, 1993). El complejo Sec consiste de un complejo Sec61p trimérico (Sec61p, Sbh1p y Sss1p), homólogo al de animales y un complejo tetramérico Sec62/63p (Sec62p, Sec63p, Sec71p y Sec72p). En la vía postraduccional, el evento de *targeting* es independiente de la SRP y de su receptor de membrana. A diferencia de lo que ocurre en la translocación cotraduccional, en el modo postraduccional se desconocen todavía los componentes que reconocen la secuencia señal aunque recientemente se ha sugerido que Sec62p, Sec71p y Sec72p pueden estar involucrados en tal reconocimiento.

Por otro lado, se ha propuesto que la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) interviene en este evento manteniendo la cadena polipeptídica en un estado competente para la translocación (Chirico y cols., 1988; Deshaies y cols., 1988).

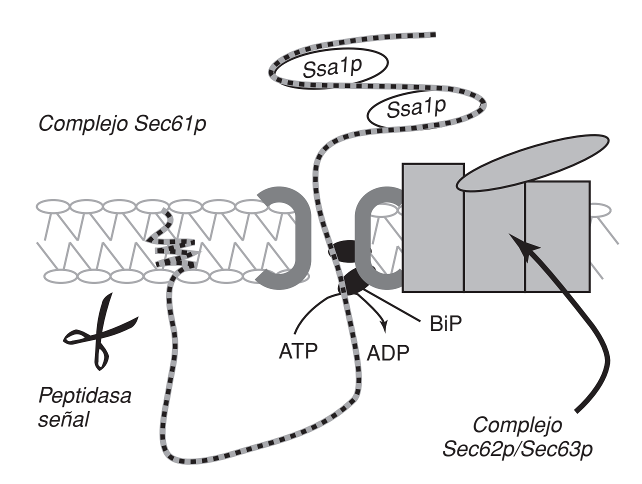


Figura 14-6. Translocación postraduccional en levaduras. Una preproteína completamente sintetizada es mantenida en una conformación competente para la translocación principalmente por su interacción con Ssa 1p (una chaperona citosólica de la familia de proteínas Hsp 70). En la membrana del RER la preproteína interactúa con el complejo proteico tetramérico Sec62p/Sec63p (que consiste de Sec62p, Sec63p, Sec71p y Sec72p) que podría funcionar como un receptor de la secuencia señal. Este complejo interactúa con el translocón en un paso dependiente de la ruptura de la secuencia señal que ocurre de manera simultánea a la translocación (tijeras).

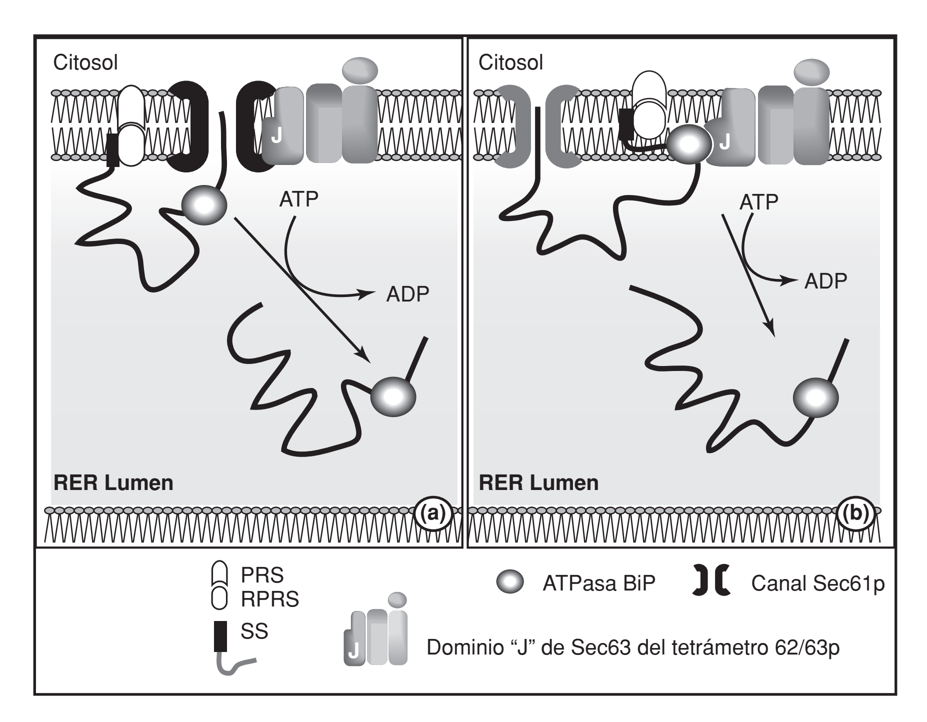


Figura 14-7. Modelos propuestos para explicar la translocación en levaduras. Una parte del canal (el dominio "J"), cataliza la unión de moléculas BiP a la proteína que se va a translocar. La ATPasa BiP evita que la proteína se deslice hacia atrás del canal que se dirija hacia el lumen del RER.

Experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* han permitido proponer dos modelos para explicar el mecanismo de transporte proteico postraduccional en levaduras. En el **primer modelo** (figura 14-7a) (*the molecular ratchet model*), la ATPasa BiP se une a una porción de la cadena polipeptídica en cuanto ésta emerge del canal Sec61p al lumen del RER evitando el movimiento retrógrado de las proteínas precursoras a través del canal de translocación (figura 14-7) (Simon y cols., 1992).

En el **segundo modelo (**figura 14-7b), se propone que BiP empuja de manera activa la cadena polipeptídica a través de la membrana, de manera que BiP actuaría como un motor generador de fuerza uniéndose simultáneamente a la proteína a ser translocada y al dominio J de Sec63p sufriendo un cambio conformacional que empuja la cadena polipeptídica a través del canal estimulando de manera activa al polipéptido hacia el lumen (Glick, 1995). En ambos casos, BiP tiene que interactuar con un dominio lumenal de Sec63p de manera ATP-dependiente para proveer la fuerza necesaria para la translocación.

Recientemente se han obtenido evidencias experimentales que apoyan el primer modelo ya que se observó que muchas moléculas de BiP se asocian con cada sustrato de translocación después de la interacción con el dominio J del componente Sec63p del complejo Sec. BiP minimiza los movimientos hacia atrás del sustrato a través del canal y la subsecuente disociación de BiP resulta en un polipéptido libre en el lumen del RER (Matlack y

cols., 1999). Además, se han desarrollado modelos matemáticos que apoyan este modelo (Liebermeister y cols., 2001).

Por otra parte, se ha propuesto que BiP, funciona en eventos tempranos del proceso de translocación tales como la apertura del poro (Brodsky y cols., 1995; Lyman y Schekman, 1995).

Integración de proteínas transmembranales a la membrana del RER

Una vez que el complejo ribosoma-cadena naciente se ha unido a la membrana del RER, el polipéptido naciente es integrado en la bicapa lipídica.

Una vez que el complejo ribosoma-cadena naciente se ha unido a la membrana del RER, el polipéptido naciente es integrado en la bicapa lipídica. La elección de la vía de procesamiento de la cadena naciente: **translocación** o **integración,** está mediada por la presencia de una secuencia transmembranal (TM) en las proteínas de membrana nacientes que consiste de 20 a 24 aminoácidos no polares que residirán en el interior hidrofóbico de la bicapa. Los polipéptidos nacientes que carecen de la secuencia TM son translocados completamente a través de la membrana del RER, por el contrario, los polipéptidos que contengan una secuencia TM serán insertados en la bicapa. Las proteínas de membrana se integran al RER utilizando el mismo aparato de translocación que transporta proteínas secretoras a través de la membrana.

El mecanismo molecular de translocación de proteínas transmembranales no se ha podido establecer de manera precisa, sin embargo, evidencias experimentales sugieren que la secuencia TM se detecta cuando emerge del ribosoma y entra en contacto con el interior hidrofóbico de la bicapa. Al parecer, la secuencia TM es reconocida por componentes proteicos del "translocón" de acuerdo al hallazgo de que los componentes Sec61α y TRAM (Rapoport, y cols., 1996), están en contacto estrecho con la secuencia TM tan pronto como ésta emerge del ribosoma (Do y cols., 1996). Una vez reconocida, la secuencia TM se orienta en la dirección adecuada en relación a la bicapa aunque todavía se desconoce el mecanismo por medio del cual el sistema identifica un segmento TM en las proteínas de membrana nacientes.

Se han propuesto tres modelos para explicar la integración de las proteínas de membrana. En el **primero** (Blobel, 1980; Sabatini y cols., 1982), se propone que el ribosoma tiene ciclos de estados unidos a la membrana y estados libres; y que las secuencias TM salen del canal de translocación hacia la bicapa antes de que termine la traducción. En el **segundo modelo,** el ribosoma permanece unido a la membrana durante toda la síntesis de la proteína de membrana y el polipéptido es enviado de manera continua al canal de translocación. Las secuencias TM no dejan el sitio de translocación antes de la terminación de la traducción (Borel y Simon, 1996; Do y cols., 1996), sino que son retenidos dentro del canal en un sitio vecino formado por otras proteínas de membrana. En pocas palabras, en este modelo el ribosoma permanece unido a la membrana durante la síntesis de la proteína y las secuencias TM dejan el canal de translocación únicamente después de la terminación de la traducción. Finalmente, en el **último modelo,** el ribosoma permanece unido a la membrana y el polipéptido entra de manera

continua en el canal de translocación y las secuencias TM salen lateralmente a la bicapa dejando el canal, en cualquier momento durante la traducción.

Recientemente, Mothes y cols., en 1997, encontraron que tanto los dominios lumenales como citosólicos de una proteína de membrana se sintetizan mientras el ribosoma está unido a la membrana de manera que aún los dominios citosólicos están en contacto con el canal de translocación. Por otro lado, los autores encuentran que antes de que se termine la traducción de una proteína, las secuencias transmembranales pueden salir lateralmente del canal de translocación y entrar en el ambiente lipídico. Sus resultados apoyan un mecanismo de integración de proteínas de membrana similar al tercer modelo mencionado anteriormente.

Modificaciones cotraduccionales y postraduccionales de las proteínas en el lumen del RER

*Glicosilación de las proteínas en el lumen del RER (*N*-glicosilación)*

Una de las funciones primordiales del RER es la adición covalente de azúcares a las proteínas. La mayoría de las proteínas solubles y de membrana presentes en el RER son glicoproteínas. En el RER, las cadenas de carbohidratos se fijan a una proteína mediante uniones *N* (al átomo de nitrógeno de un residuo de asparagina Asn) por lo que se dice que los oligosacáridos están "*N*-linked" y son los que se encuentran más comúnmente en las glicoproteínas.

Una de las funciones primordiales del RER es la adición covalente de azúcares a las proteínas.

En el RER, las cadenas de carbohidratos se fijan a una proteína mediante uniones *N* (al átomo de nitrógeno de un residuo de asparagina Asn) por lo que se dice que los oligosacáridos están "*N*-linked" y son los que se encuentran más comúnmente en las glicoproteínas.

Los elementos moleculares involucrados en la glicosilación de proteínas son: la enzima oligosacariltransferasa, el oligosacárido precursor, la molécula lipídica especial llamada dolicol fosfato y la asparagina blanco en la proteína a transformarse en glicoproteína en el lúmen del RER. Los elementos moleculares involucrados en la desglicosilación y desmanosidación de los oligosacáridos transferidos en el lumen del RER a las proteínas son la UDP-Glc: glicoproteína glicosiltransferasa, la glucosidasa I y II y las α-manosidasas I y II. La presencia de la secuencia consenso de glicosilación en la proteína naciente (Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro), es necesaria pero no suficiente para la glicosilación.

El oligosacárido precursor (figura 14-8) se construye azúcar por azúcar en la molécula lipídica dolicol unida a la membrana antes de su transporte a la proteína. Los azúcares son activados primero en el citosol por la formación de intermediarios nucleótido-azúcar, que posteriormente donan su azúcar al lípido (dolicol) en una secuencia ordenada. En la primera parte de este proceso, el oligosacárido unido al dolicol, que está constituido por cinco residuos de manosa y dos de *N*-acetilglucosamina ($Man_5GlcNAc_2$), viaja a través de la membrana, desde el lado citosólico al lado lumenal de la membrana del RER. Los azúcares restantes (cuatro residuos de manosa y tres de glucosa), se añaden en el lado lumenal de la membrana. Una vez que el oligosacárido ($Glc_3Man_9GlcNAc_2$) está completamente ensamblado se trans-

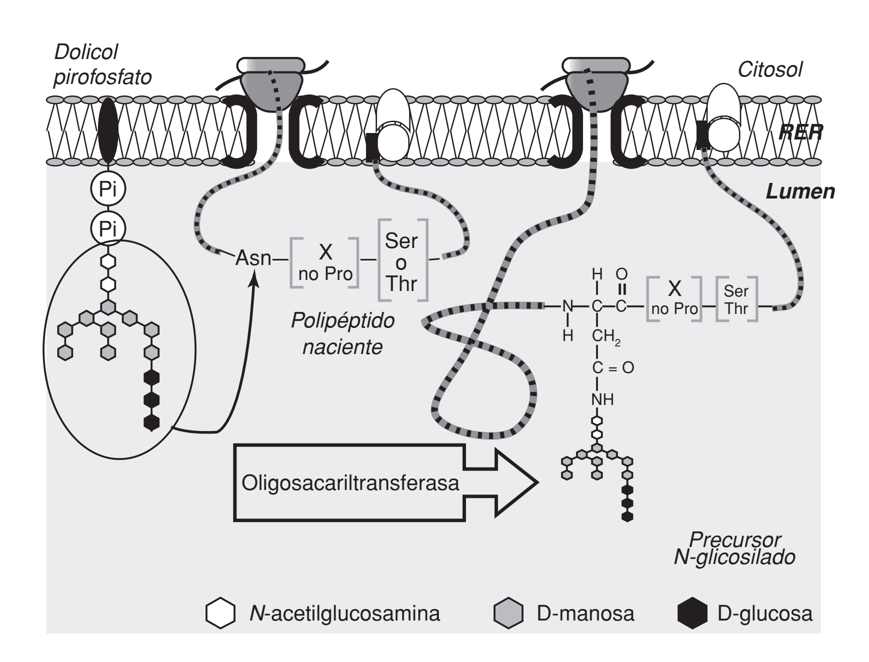


Figura 14-8. *N*-glicosilación.

fiere a un residuo de asparagina del polipéptido naciente por la oligosacariltransferasa. El dolicol-PP regresa a través de la membrana y está listo para iniciar un nuevo ciclo de aceptación de azúcares. El oligosacárido precursor está unido a la membrana del RER por la molécula dolicol pirofosfato por una unión pirofosfato de alta energía que provee la energía de activación necesaria para que la glicosilación se lleve a cabo.

La adición del oligosacárido ocurre cuando el residuo de asparagina aceptor en el péptido naciente está a una distancia de aproximadamente 12 a 14 residuos de aminoácidos de la membrana (Nilsson y Von Heijne, 1993).

El oligosacárido es transferido a la asparagina blanco por la enzima oligosacariltransferasa en un solo paso catalítico. Esta enzima tiene su sitio activo expuesto al lado lumenal de la membrana del RER lo que explica porque las proteínas citosólicas no son glicosiladas.

En el RER, se remueven rápidamente tres residuos de glucosa y uno de manosa de los oligosacáridos de la mayoría de las glicoproteínas por la acción secuencial de la glucosidasa I y II y de las α-manosidasas I y II, respectivamente. El procesamiento de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ se inicia inmediatamente después de la transferencia al polipéptido naciente (figura 14-9). La glucosidasa I remueve la glucosa más externa (α1-2 linked) y la glucosidasa II remueve los dos residuos restantes (α1-3 linked). Los glicanos desprovistos de glucosa y con un alto contenido de manosa pueden volver a glicosilarse por la UDP-glucosa: glicoproteína glicosiltransferasa si es que las proteínas en las cuales están presentes no se encuentran completamente plegadas o ensambladas. La acción combinada de las enzimas α-manosidasas I y II generan el isómero $Man_7GlcNAc_2$. El ciclo de desglicosilación-reglicosilación continúa hasta que se logra el plegamiento adecuado de las proteínas.

Los *N*-oligosacáridos tienen la función de proveer grupos hidrofílicos que ayudan a mantener a las glicoproteínas en solución durante el proceso

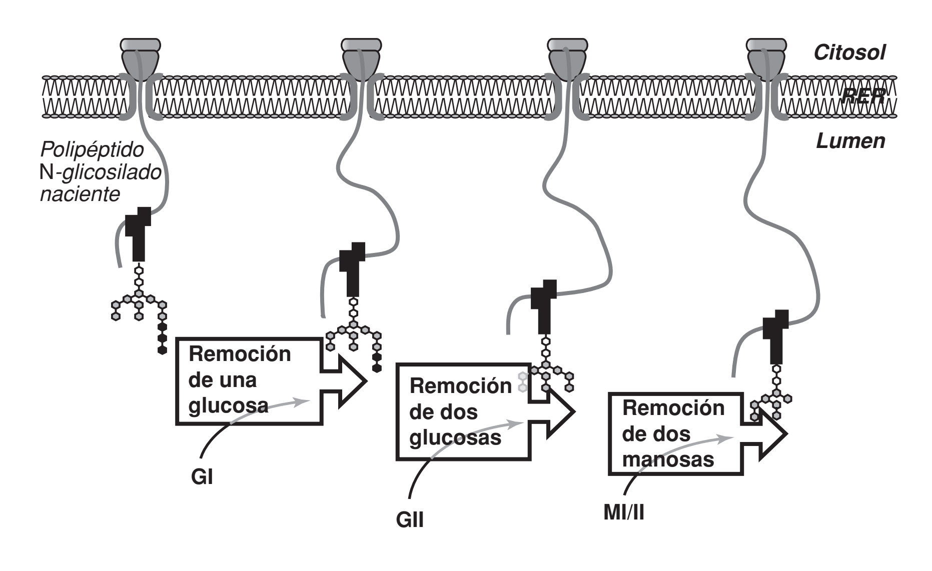


Figura 14-9. Reacciones del proceso de maduración de los oligosacáridos que ocurren en el RE.

de plegamiento y modulan la conformación de las proteínas forzando a los aminoácidos cercanos a la asparagina a estar en proximidad a la interfase agua-glicoproteína. Además, la interacción de los oligosacáridos monoglicosilados con las lectinas del RER potencia el efecto de facilitación de plegamiento del núcleo de alto contenido de manosa y provee un mecanismo para retener las moléculas que todavía no han sido plegadas adecuadamente en el RER (Parodi, 2000).

Plegamiento de proteínas en el lumen del retículo endoplásmico

Las proteínas que entran a la vía secretora adquieren su estructura terciaria y en algunos casos su estructura cuaternaria en el RER.

Las proteínas que entran a la vía secretora adquieren su estructura terciaria y en algunos casos su estructura cuaternaria en el RER. El lumen del RER difiere significativamente del citosol y de otros sitios subcelulares importantes de plegamiento de proteínas en las células eucariontes en las que el lumen presenta una concentración mucho más alta de Ca^{2+} y un ambiente oxidante que facilita la formación de puentes disulfuro (Parodi, 2000). Muchas proteínas residentes del RER tienen capacidad de unir Ca^{2+} y la función de varias "chaperonas" y proteínas que intervienen en el plegamiento de otras proteínas depende de las concentraciones adecuadas de Ca^{2+} (Meldolesi, 1998).

En las células de mamíferos y levaduras se han identificado varias proteínas que catalizan la formación de puentes disulfuro en el RER: la proteína disulfuro isomerasa (PDI o Erp59), Erp72, CaBPI (o P5), Erp57 (o Erp61), etc. Estas enzimas tienen actividades de tiol: proteína disulfuro oxidoreductasa e isomerasa. En algunos casos también se comportan como chaperones moleculares y/o despliegan actividad proteolítica (Parodi, 2000).

El RER también tiene chaperones moleculares clásicos como BiP (GRP78), GRP94 y GRP170.

El RER también tiene chaperones moleculares clásicos como BiP (GRP78), GRP94 y GRP170. La expresión de estas proteínas así como la de la proteína disulfuro isomerasa se incrementa con la privación de glucosa o bajo otras condiciones de estrés celular que causan la acumulación de proteínas mal plegadas en el RER (*unfolded protein response*) (Pahl y Baeuerle, 1997). BiP es miembro de la familia Hsp70 de ATPasas y es una proteína multifuncional que interactúa de manera pasajera con los polipéptidos recién sintetizados durante su plegamiento y ensamblaje. El ATP es necesario para la liberación de los péptidos unidos a BiP.

Otros chaperones moleculares son calnexina (también llamada p88 e IP90) y calreticulina. Ambas proteínas son lectinas que reconocen glicoproteínas en el lumen del RER. El sistema calnexina/calreticulina/glicosiltransferasa interactúa específicamente con las glicoproteínas nacientes incrementando la eficiencia de plegamiento tanto en células vivas como en microsomas (figura 14-10). El reconocimiento de las glicoproteínas está mediado por los oligosacáridos monoglicosilados unidos a las proteínas.

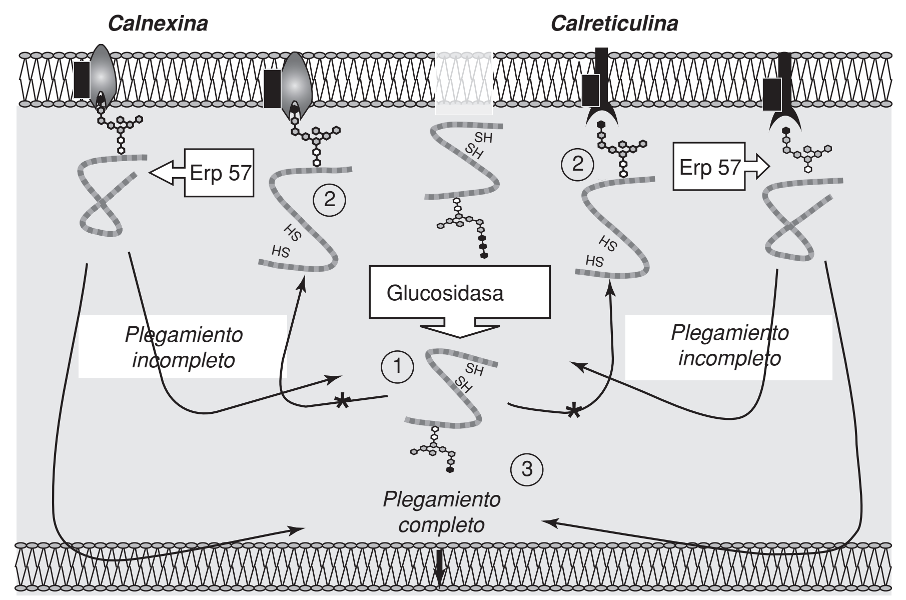


Figura 14-10. Modelo del plegamiento de glicoproteínas en el lumen del RE. Las cadenas laterales de oligosacáridos "*N*-linked" presentes en las glicoproteínas recién sintetizadas son recortadas rápidamente por las glucosidasas I y II para generar formas monoglucosiladas de los oligosacáridos (paso 1). A estas proteínas monoglucosiladas se une la lectina calnexina y/o calreticulina. Debido a que la lectina (calnexina o calreticulina) se une de manera estable a Erp57 entra en contacto con las glicoproteínas y modula su plegamiento (paso 2). En este modelo se propone a Erp57 como el promotor de la formación de puentes disulfuro. La glicoproteína se libera de calnexina o calreticulina y de Erp57 después de la remoción del último residuo de glucosa del glicano por la glucosidasa II. Si el plegamiento es exitoso, la glicoproteína nativa se transporta a través de la vía secretora (paso 3). Si la glicoproteína se pliega incorrectamente el sensor de plegamiento UGGT añade un solo residuo de glucosa y la glicoproteína sufre otro round de unión de las lectinas y de Erp57 (reentra al paso 2*).

Estos oligosacáridos contienen glucosa (Glc), manosa (Man), y *N*-acetyl-glucosamina (GlcNAc) en la forma general $Glc_1Man_{7\text{-}9}GlcNAc_2$. La posterior desglicosilación de los oligosacáridos por la glucosidasa II libera a las glicoproteínas de su interacción con calnexina/calreticulina. Los glicanos monoglicosilados son "reformados" o reglicosilados después por la UDP-Glc: glucoprotein glicosiltransferasa (GT), reconocidos otra vez por las lectinas

Tabla 14-2. Proteínas solubles del lumen del retículo endoplásmico.

Proteína	Función
Disulfuro Isomerasa (PDI)	Cataliza la formación de puentes disulfuro
Erp72	Homólogo de PDI. Plegamiento de proteínas (Frand y cols.) y reconocimiento de proteínas no plegadas en el RE (Ferrari y Soling, 1999)
Erp57	Al parecer participa junto con calreticulina y calnexina modulando el plegamiento de glicoproteínas y, por lo tanto, actúa como chaperona molecular (High y cols., 2000)
BiP	Plegamiento y ensamblaje de proteínas, translocación, control de calidad en el RE
Calreticulina	Reconoce proteínas con una o más cadenas laterales de oligosacáridos monoglicosilados y modula su plegamiento
Reticulocalbina	Une calcio
Proteína de *heat-shock* Hsp47	Se une a la colágena y podría actuar como chaperona en la vía biosintética de la colágena
Glucosidasa II	Remueve los dos residuos α1-3 linked del oligosacárido en las glicoproteínas
UDP-Glc: glucoprotein glicosiltransferasa	*N*-glicosilación. Sólo reconoce glicoproteínas no nativas

Tabla 14-3. Proteínas de membrana del retículo endoplásmico.

Proteína	Función
P34	Receptor de ribosomas y posiblemente componente del translocón (Tazawa y cols., 1991)
P180	Receptor de ribosomas y posiblemente forma parte del translocón (Savitz y Meyer 1990 y 1993)
Riboforina I	Receptor de ribosomas y posiblemente forma parte del translocón (Marcantonio y cols., 1984; Yu y cols., 1990)
Sec61(α)	Receptor de ribosomas en el translocón
TRAM	Involucrada en la translocación de proteínas
Proteína *docking* o receptor de la partícula de reconocimiento de la señal SRPR	Reconoce a la partícula de reconocimiento de la señal (SRP)
Calnexina	Reconoce proteínas con una o más cadenas laterales de oligosacáridos monoglicosilados y modula su plegamiento
Glucosidasa I	Glicoproteína. Remueve la glucosa terminal α1-2 linked

sólo cuando se unen a residuos proteicos plegados de manera incorrecta ya que GT se comporta como un sensor de conformaciones de glicoproteínas. El ciclo de desglicosilación-reglicosilación continúa hasta que se logre el plegamiento adecuado (Parodi, 2000). La interacción lectina-oligosacárido monoglicosilado es una de las vías alternativas por medio de las cuales la célula retiene las glicoproteínas plegadas incorrectamente en el RE. Aunque este mecanismo decrece la tasa de plegamiento, incrementa su eficiencia, previene la oligomerización prematura de glicoproteínas y su degradación y evita la formación de puentes disulfuro no nativos impidiendo la agregación y permitiendo la interacción de residuos de glicoproteínas con los chaperones clásicos y con otras proteínas que intervienen en el plegamiento (Parodi, 2000).



Control de calidad en el RE

Los eucariontes han desarrollado un mecanismo de control de calidad en el retículo endoplásmico. Sólo las proteínas que se pliegan y ensamblan correctamente pueden entrar en las vesículas de transporte que se dirigen del RE al aparato de Golgi. Inicialmente se creía que la degradación de proteínas no funcionales ocurría en el RER (Klausner y Sitia, 1990), pero más recientemente se ha reconocido que estas proteínas son exportadas del RER y degradadas en el citosol en un proceso conocido como degradación asociada al RER (*ER-associated degradation*) (*ERAD*) (Romisch, 1999; Lord y cols., 2000). Trabajos recientes indican que las proteínas mal plegadas son degradadas por “proteosomas” en el citosol (Wiertz y cols., 1996a; Jensen y cols., 1995; Werner y cols., 1996).

Recientemente han surgido evidencias experimentales que indican que algunos componentes del aparato de translocación (el “translocón”), pueden estar involucrados en el transporte retrógrado de proteínas desde el lumen del RE hacia el citoplasma (Brodsky y McCracken, 1997; Kopito, 1997). Wiertz y cols., fueron los primeros en sugerir que Sec61 es responsable del transporte retrógrado, demostrando la dislocación de una proteína transmembranal de la membrana del RER hacia el citosol antes de la degradación (Wiertz y cols., 1996a). Posteriormente se demostró que una proteína de membrana destinada a la degradación, se asocia con Sec61β antes de ser exportada al citosol (Wiertz y cols., 1996b).

Todavía no se conoce la regulación del tráfico bidireccional de proteínas a través del canal Sec61. En el transporte retrógrado, el canal parece ser un conducto pasivo y la direccionalidad del transporte parece estar determinada por proteínas accesorias. Numerosas proteínas del lumen del RER y proteínas de membrana parecen estar involucradas en el proceso de retrotranslocación como las proteínas Kar2/BiP y calnexina (Brodsky y cols., 1995), Sec63p (Plemper y cols., 1997), la proteína disulfuro isomerasa, Der 1p (Knop y cols., 1996), Hrd3p y Der3p/Hrd1p (Hampton y cols., 1996; Bordallo y cols., 1998). Aún no es claro en qué medida estas proteínas interactúan directamente con el “translocón” para influenciar el movimiento del polipéptido.



Exportación de proteínas del RER

Una vez plegadas y ensambladas adecuadamente, las proteínas de secreción son incorporadas en vesículas de transporte destinadas al aparato de Golgi. En la actualidad se desconocen los mecanismos moleculares en el lumen del RER que llevan a la incorporación de las proteínas en vesículas. Hace quince años, se postulaba la presencia de señales de exportación presentes en la estructura de las proteínas secretoras y las diferencias en las tasas de secreción de las mismas se atribuían a diferencias en las señales de exportación. Actualmente todavía no se puede concluir que todas las proteínas solubles y membranales ("cargos") empleen señales para su transporte anterógrado (Herrmann y cols., 1999).

Una vez plegadas y ensambladas adecuadamente, las proteínas de secreción son incorporadas en vesículas de transporte destinadas al aparato de Golgi.

Se ha propuesto la presencia de proteínas accesorias (receptores de transporte) en el RER que interactúan con proteínas secretoras específicas en el compartimento donador y las guían dentro de vesículas de transporte adecuadas. Estos receptores interactúan directa o indirectamente con las proteínas de cubierta que forman las vesículas de transporte sirviendo como adaptadores que unen a la maquinaria de formación de vesículas con el reclutamiento de cargos. En el compartimento trans-Golgi y en la membrana plasmática está bien documentada la presencia de tales moléculas adaptadoras que facilitan la concentración del cargo en vesículas con cubiertas de clatrina. Sin embargo, todavía no está claro si hay moléculas análogas que actúen también como sitios de formación de vesículas (*budding*) en el RER y que estén involucradas en el transporte entre este compartimento y el aparato de Golgi.

Hasta el momento, hay evidencias que sugieren la existencia de receptores de transporte y de señales de clasificación (*sorting*) positivas que dirigen a las proteínas secretoras a vesículas de transporte derivadas del RER destinadas al aparato de Golgi. Dado que las proteínas "cargo" incluyen proteínas solubles y las que atraviesan la membrana una o varias veces, el proceso de empaquetamiento involucra diferentes mecanismos. Por ejemplo, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, Shr3p reconoce a los aminoácidos recién sintetizados de las permeasas y los entrega a las vesículas de COPII naciente, sin embargo, Shr3p permanece en el RER. Otro ejemplo es Erv14p que acompaña a las moléculas recién sintetizadas de la proteína de membrana AX12p a las vesículas COPII y viaja junto con ellas al aparato de Golgi (Powers y Barlowe, 1998). El transporte RER-Golgi involucra a la proteína de cubierta II (COPII).

El transporte RER-Golgi involucra a la proteína de cubierta II (COPII).

Las vesículas de COPII acarrean a las proteínas recién sintetizadas del RER a Golgi y median el transporte selectivo de cargos aunque también se ha propuesto que algunas proteínas salen del RER de manera no selectiva. La mayoría de las proteínas que son empaquetadas en vesículas COPII interactúan específicamente con subunidades de cubierta y/o receptores cargo (Herrmann y cols., 1999). La cubierta de COPII está constituida de los complejos proteicos Sec13p/Sec31p, Sec23p/Sec24p y de la GTPasa Sar1p (Barlowe y cols., 1994). Estos componentes purificados son suficientes para generar la formación de vesículas del RE *in vitro* capaces de dirigirse y fusionarse con el aparato de Golgi.

Se han propuesto dos modelos para la incorporación del cargo en vesículas de COPII derivadas del RE y para explicar la exportación de proteínas solubles del retículo endoplásmico. El modelo de transporte activo y el modelo de flujo en grandes cantidades (*bulk-flow*).

El modelo de transporte activo involucra un receptor que se une a las proteínas "cargo" para activar la formación de una vesícula de cubierta. En este modelo las proteínas residentes del RER no se unen al receptor pero pueden quedar atrapadas en el lumen de la vesícula. Este modelo predice la existencia de un receptor para la exportación del RER pero hasta el momento éste no ha sido identificado. Por el contrario, los eventos del lado citosólico de la membrana del RER que llevan al reclutamiento y a la formación de vesículas anterógradas sí son bien conocidos. En este último proceso, la proteína Sec12p interactúa con SAR1p, una proteína de unión a GTP que regula el reclutamiento de las cubiertas a la membrana. Sec12p es una proteína tipo II que atraviesa la membrana con un extremo carboxiloterminal lumenal glicosilado y que no se encuentra en las vesículas de transporte anterógrado. Se ha propuesto que, de existir un receptor de exportación, éste interactuaría con Sec12p.

El modelo de flujo en grandes cantidades (*bulk-flow*) implica la formación espontánea de vesículas, activada probablemente por una proteína que atraviesa la membrana y que interactúa con la cubierta. En este modelo tanto las proteínas residentes como las de secreción y vacuolares son dirigidas a las vesículas por difusión. Este modelo está apoyado por el hecho de que proteínas citosólicas son secretadas cuando son translocadas al lumen del RE vía su fusión con péptidos señal.

El proceso de empaquetamiento involucra varios mecanismos diferentes. Hasta el momento se han propuesto tres familias de proteínas como receptores de transporte: BAP31 que es una proteína transmembranal de mamíferos que se une específicamente a una forma recién sintetizada de la proteína de membrana endosomal celubrevina y por medio de inmunoflourescencia se localizó esta proteína en el RER y en el compartimento intermedio RER-Golgi (ERGIC). La truncación del extremo carboxilo-terminal citoplásmico de BAP31 no afecta su interacción con celubrevina pero causa una acumulación de BAP31 y celubrevina en el RER (Annaert y cols., 1997). Esto sugiere que BAP31 actúa como un receptor de transporte para celubrevina y que su cola citoplásmica contiene una señal de exportación.

ERGIC-53 de mamíferos es un tipo de proteína transmembranal tipo 1 y un componente abundante de las vesículas derivadas del RER y de ERGIC. ERGIC-53 posee un dominio lumenal tipo lectina y una cola citoplásmica corta, esta cola citosólica contiene sitios de unión tanto para COPII (la cubierta del RER al aparato de Golgi) y COPI (la cubierta del aparato de Golgi a RER), y la proteína oscila entre el RER y el aparato de Golgi. Aunque no se ha demostrado la unión directa de ERGIC-53 a las proteínas secretoras en el RER, la presencia de un dominio tipo lectina que se une a residuos de manosa (Arar y cols., 1995), sugiere que ERGIC-53 podría servir como un adaptador entre un cargo glicosilado y los componentes de la cubierta.

Las proteínas p24 también se han propuesto como receptores de transporte. Representan una familia de proteínas transmembranales del tipo I

que son componentes abundantes de las vesículas COPI y COPII. Tienen un dominio lumenal grande y un dominio citoplásmico corto que contiene señales de transporte anterógrado y retrógrado. La deleción de un homólogo de p24 en levaduras hace más lenta la secreción de una serie de proteínas (Schimmoller y cols., 1995), pero no hay una evidencia clara de una interacción directa entre el cargo y las proteínas p24.

Las vesículas geman del RER y entregan su contenido al aparato de Golgi donde las proteínas secretoras son modificadas en ruta a sus destinos finales, lo cual requiere que las membranas de las vesículas derivadas del RER y las del aparato de Golgi se reconozcan unas a otras (*targeting*) y se fusionen de manera que el contenido de las vesículas sea liberado al aparato de Golgi.

Las proteínas de cubierta que dirigen la gemación de vesículas del RER al aparato de Golgi se denominan COPII. El *targeting* y fusión de estas vesículas con la membrana al aparato de Golgi depende de un grupo separado de proteínas llamadas colectivamente SNAREs que son proteínas integrales de membrana que se proyectan en el citoplasma. La familia SNARE está compuesta de un gran número de proteínas seleccionadas que regulan gran variedad de eventos de tráfico diferentes en la célula.

> Las proteínas de cubierta que dirigen la gemación de vesículas del RER al aparato de Golgi se denominan COPII.

Muchos investigadores están de acuerdo que el ensamblaje de varias proteínas SNAREs en un complejo que forma un puente entre la vesícula y su membrana blanco es un evento clave en la fusión. Este complejo SNARE está compuesto de un manojo de cuatro helices α "construídas" por más de cuatro SNAREs diferentes con todos los dominios transmembranales de las SNAREs agrupados en un extremo del manojo. Algunos argumentan que el ensamblaje del complejo SNARE resulta directamente en la fusión de membranas, otros sugieren que son esenciales eventos adicionales "río abajo".



Referencias bibliográficas

Alberts, B.; Johson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*, 4a. ed., Garland Science, Nueva York, EE.UU., 2002.

Annaert, W.G.; Becker, B.; Kistner, U.; Reth, M. y Jahn, R., "Export of cellubrevin from the endoplasmic reticulum is controlled by BAP31", *J. Cell Biol.,* **139:** 1397-1410, 1997.

Arar, C.; Carpentier, V.; Le Caer, J.P.; Monsigny, M.; Legrand, A. y Roche, A.C., "ERGIC-53, a membrane protein of the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment, is identical to MR60, an intracellular mannose-specific lectin of myelomonocytic cells", *J. Biol. Chem.,* **270:** 3551-3553, 1995.

Aubier, M. y Viires, N., "Calcium ATPase and respiratory muscle function", *European Respiratory Journal,* **11:** 758-766, 1998.

Bacher, G.; Lütcke, H.; Jungnickel, B.; Rapoport, T.A. y Dobberstein, B., "Regulation by the ribosome of the GTPase of the signal-recognition particle during protein targeting", *Nature,* **381:** 248-251, 1996.

Batenburg, J.J., "Surfactant phospholipids: synthesis and storage", *Am. J. Physiol.,* **262(4 Pt 1):** L367-L385, 1992.

Berciano, M.T.; Fernández, R.; Pena, E.; Calle, E.; Villagra, N.T.; Rodríguez-Rey, J.C. y Lafarga, M., "Formation of intranuclear crystalloids and proliferation of the smooth endoplasmic reticulum in schwann cells induced by tellurium treatment: association with overexpression of HMG CoA reductase and HMG CoA synthase mRNA", *Glia,* **29:** 125-133, 2000.

Blobel, G., "Intracellular protein topogenesis", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **77:** 1496-1500, 1980.

Bordallo, J.; Plemper, R.K.; Finger, A. y Wolf, D.H., "Der3p/Hrd 1 p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded lumenal and integral membrane proteins", *Mol. Biol. Cell,* **9:** 209-222, 1998.

Borel, A.C. y Simon, S.M., "Biogenesis of polytopic membrane proteins: membrane segments assemble within translocation channels prior to membrane integration", *Cell,* **85:** 379-389, 1996.

Brodsky, J.L., "Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane", *International Review of Cytology,* **178:** 277-328, 1998.

———— ; Gueckclar, J. y Schekman, R., "BiP and Sec63p are required for both co-and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **92:** 9643-9646, 1995.

———— y McCracken, A.A., "ER-associated and proteosome-mediated protein degradation: how two topologically restricted events came together", *Trends Cell Biol.,* **7:** 151-156, 1997.

Brodsky, S.L. y Schekman, R., "A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome", *J. Cell Biol.,* **123:** 1355-1363, 1993.

Chen, W.; Helenius, J.; Braakman, I. y Helenius, A., "Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein Syntesis", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **92:** 6229-6233, 1995.

Chevet, E.; Cameron, P.H.; Pelletier, M.F.; Thomas, D.Y. y Bergeron, J.J., "The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation", *Current Opinion on Structural Biology,* **11(1):** 120-124, 2001.

Childs, G.V., "Spinal Cord Histology", URL Address: http://cellbio.utmb.edu/microanatomy, 1998.

Chirico, W.J.; Waters, M.G. y Blobel, G., "**+ /0K heat shock related proteins stimulate protein translocation in microsomes", *Nature,* **332:** 805-810, 1988.

Chrispeels, M.J. y Herman, E.M., "Endoplasmic reticulum-derived compartments function in storage an as a mediators of vacuolar remodeling via a new type of organelle, precursosr protease vesicles", *Plant Physiology,* **123:** 1227-1233, 2000.

Cleves, A.E., "Protein transport: The nonclassical ins and outs", *Current Opinion in Cell Biology,* **7(5):** R318-R320, 1997.

Connolly, T. y Gilmore, R., "GTP hydrolysis by complexes of the signal recognition particle and the signal recognition particle receptor", *J. Cell Biol.,* **123:** 799-807, 1993.

Deshaies, R.J.; Koch, B.D.; Werner, W.M.; Craig, E.A. y Schekman, R., "A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides", *Nature,* **332:** 800-805, 1988.

Do, H.; Falcone, D.; Lin, J.; Andrews, D.W. y Johnson, A.E., "The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process", *Cell,* **85:** 369-378, 1996.

Ellgaard, L.; Molinari, M. y Helenius, A., "Setting the standards: quality control in the secretory pathway", *Science,* **286(5446):** 1882-1888, 1999.

Fawcett, D.W. "The cell", 2a ed., W.B. Saunders Company, 1981.

Ferrari, D.M. y Soling, H.D., "The protein disulphide-isomerase family: unraveling a string of folds", *Biochem. J.,* **339:** 1-10, 1999.

Frand, A.R.; Cuozzo, J.W. y Kaiser, C.A., "Pathways for protein disulphide bond formation", *Trends in Cell Biol.,* **10:** 203-210, 2000.

Furuya, Y.; Lundmo, P.; Short, A.D.; Gill, D.L. e Isaacs, J.T., "The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen –independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin", *Cancer Res.,* **54(23):** 6167-6175, 1994.

Galili, G.; Sengupta-Gopalan, Ch. y Ceriotti, A., "The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies", *Plant Molecular Biology,* **38:** 1-29, 1998.

Gilbert, H.F., "Protein disulfide isomerase and assisted protein folding", *J. Biol. Chem.,* **272:** 29399-29402, 1997.

Glick, B.S., "Can Hsp70 proteins act as force-generating motors", *Cell,* **80:** 11-14, 1995.

Golovina, V.A. y Blaustein, M.P., "Spatially and functionally distinct Ca^{2+} stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum", *Science,* **275:** 1643-1648, 1997.

Gorlich, D. y Rapoport, T.A., "Protein Translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane", *Cell,* **75:** 615-630, 1993.

Gray, H., *Anatomy of the Human body,* Lea y Febiger, Philadelphia, 1918; Bartleby.com, 2000; www.barley.com/107/, 15 de marzo de 2001.

Gruss, O.J.; Feick, P.; Frank, R. y Dobberstein, B., "Phosphorilation of components of the ER translocation site", *Eur. J. Biochem.,* **260:** 785-793, 1999.

Hamman, B.D.; Chen, J.C.; Johnson, E.E. y Johnson, A.E., "The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40 a 60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane", *Cell,* **89:** 535-544, 1997.

——— ; Hendershot, L.M. y Johnson, A.E., "BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the lumenal end of the translocon pore before and early in translocation", *Cell,* **92:** 747-758, 1998.

Hampton, R.Y.; Gardner, R.G. y Rine, J., "Role of 26S proteosome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein", *Mol. Biol. Cell,* **7:** 2029-2044, 1996.

Hann, B.C. y Walter, P., "The signal recognition particle in *S. cerevisiae*", *Cell,* **67:** 131-144, 1991.

Hasler, J.A.; Estabrook, R.; Murray, M.; Pikuleva, I.; Waterman, M.; Capdevila, J.; Holla, V.; Helvig, Ch.; Falck, J.R.; Farrell, G.; Kaminsky, L.S.; Spivack, S.D.; Boitier, E. y Beaune, Ph., "Human cytochromes P450", *Molecular Aspects of Medicine,* **20:** 1-137, 1999.

Herrmann, J.M.; Malkus, P. y Schekman, R., "Out of the ER—outfitters, escorts and guides", *Trends in Cell Biol.,* **9:** 5-7, 1999.

High, S.; Fabienne, J.L.; Lecompte, S.; Russell, S.J.; Abell, B.M. y Oliver, J.D., "Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones?", *FEBS Letters,* **476:** 38-41, 2000.

Hirschberg, C.B.; Robbins, P.W. y Abeijon, C., "Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus", *Annual Review of Biochemistry,* **67:** 46-69, 1998.

Ishimura, K., "The mechanisms of corticoids biosynthesis revealed by immunohistochemistry and in situ hybridization", *Kaibogaku Zasshi,* **73(2):** 111-118, 1998.

——— y Fujita, H., "Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzimes", *Microscopy Research and Technique,* **36:** 445-453, 1997.

Jensen, T.J.; Loo, M.A.; Pind, S.; Williams, D.B.; Goldberg, A.L. y Riordan, J.R., "Multiple proteolytic systems, including the proteosome, contribute to CFTR processing", *Cell,* **83:** 129-135, 1995.

Jesch, S.A. y Linstedt, A.D., "The Golgi and Endoplasmic Reticulum remain independent during mitosis in HeLa cells", *Molecular Biology of the Cell,* **9:** 623-635, 1998.

Johnson, A.E. y Van Waes, M.A., "The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.,* **15:** 799-842, 1999.

Jungnickel, B. y Rapoport, T.A., "A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane", *Cell,* **82:** 261-270, 1995.

Kalies, K.U.; Gorlich, D. y Rapoport, T.A., "Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex", *J. Cell Biol.,* **126:** 925-934, 1994.

Karp, G., *Cell and Molecular Biology, Concepts and Experiments*, John Wiley and Sons Inc., EE.UU., 1996.

Khan, I.; Sandhu, V.; Misquitta, C.M. y Grover, A.K., "SERCA pump isoform expression in endothelium of veins and arteries: Every endothelium is not the same", *Molecular and Cellular Biochemistry,* **203:** 11-15, 2000.

Klausner, R.D. y Sitia, R., "Protein degradation in the endoplasmic reticulum", *Cell,* **24:** 611-614, 1990.

Klumperman, J., "Transport between ER and Golgi", *Current Opinion on Cell Biology,* **12(4):** 445-449, 2000.

Knop, M.; Finger, A.; Braun, T.; Hellmuth, K. y Wolf, D.H., "Der 1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast", *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **15:** 753-763, 1996.

Koch, G.L.E.; Booth, C. y Wooding, F.B.P., "Dissociation and re-assembly of the endoplasmic reticulum in live cells", *Journal of Cell Science,* **91:** 511-522, 1988.

Kopito, R.R., "ER quality control: the cytoplasmic connection", *Cell,* **88:** 427-430, 1997.

Lewis, M.J. y Pelham, H.R., "Sequence of a second human KDEL receptor", *J. Mol. Biol.,* **226:** 913-916, 1992.

Liebermeister, W.; Rapoport, T.A. y Heinrich, R., "Ratchening in post-translational protein translocation: A mathematical model", *J. Mol. Biol.,* **305:** 643-656, 2001.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, P.; Matsudaira, P. y Darnell, J., *Molecular Cell Biology*, 4a. ed., Media Connected WH Freeman and Co., Nueva York, EE.UU., 2000.

Lompré, A.M., "Sarcoplasmic reticulum in vascular cells in hypertension and during proliferation", *Clinical an Experimental Pharmacology and Physiology,* **26:** 553-557, 1999.

Lord, J.M.; Davey, J.; Frigerio, L. y Roberts, L.M., "Endoplasmic reticulum-associated protein degradation", *Sem. Cell Dev. Biol.,* **11:** 159-164, 2000.

Lyman, S.K. y Schekman, R., "Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae", J. Cell Biol.,* **131:** 1163-1171, 1995.

Marcantonio, E.E.; Amar-Costesec, A. y Kreibich, G., "Segregation of the polypeptide translocation apparatus to regions of the endoplasmic reticulum containing ribophorins and ribosomes. II. Rat liver microsomal subfractions contain equimolar amounts of ribophorins and ribosomes", *J. Cell Biol.,* **99:** 2254-2259, 1984.

Margreth, A.; Damiani, E. y Bortoloso, E., "Sarcoplasmic reticulum in aged skeletal muscle", *Acta Physiol. Scand.,* **167:** 331-338, 1999.

Matlack, K.E.; Misselwitz, K.P. y Rapoport, T.A., "BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-α Factor across the ER membrane", *Cell,* **97:** 553-564, 1999.

Mattson, M.P.; LaFerla, F.M.; Chan, S.L.; Leissring, M.A.; Shepel, P.N. y Geiger, J.D., "Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders", *Trends in Neurosciences,* **23:** 222-229, 2000.

Meldolesi, J. y Pozzan, T., *Trends Biochem. Sci.,* **23:** 10-14, 1998.

Miller, J.D.; Wilhem, H.; Giewrasch, L.; Gilmore, R. y Walter, P., "GTP binding and hydrolysis by the signal recognition particle during initiation of protein translocation", *Nature,* **366:** 351-354, 1993.

Mothes, W.; Heinrich, S.U.; Graf, R.; Nilsson, Y.; Von Heijne, G.; Brunner, J. y Rapoport, T.A., "Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum", *Cell,* **89:** 523-533, 1997.

———— ; Jungnickel, B.; Brunner, J. y Rapoport, T.A., "Signal sequence recognition in cotranslational translocation by protein components of the endoplasmic reticulum membrane", *J. Cell Biol.,* **142:** 355-364, 1998.

Muesch, A.; Hartmann, E.; Rohde, K.; Rubartelli, A.; Sitia, R. y Rapoport, T.A., "A novel pathway for secretoy proteins?", *Trends in Biochemistry Science,* **15(3):** 86-88, 1990.

Munro, S. y Pelham, H.R.B., "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins", *Cell,* **48:** 899-907, 1987.

Murphy, D.J. y Vance, J., "Mechanisms of lipid body formation", *Trends in Biochemistry Scinece,* **24:** 109-115, 1999.

Nilsson, I.M. y Von Heijne, G., *J. Biol. Chem.,* **268:** 5798-5801, 1993.

Pahl, H.L. y Baeuerle, P.A., *Trends Cell Biol.,* **7:** 50-55, 1997.

Palade, G., "Intracellular aspects of the process of protein synthesis", *Science,* **189:** 347-358, 1975.

Panzner, S.; Dreier, L.; Hartmann, E.; Kostka, S. y Rapoport, T.A., "Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p", *Cell,* **81:** 561-570, 1995.

Parodi, A.J., "The quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum, a trip fron trypanosomes to mammals", *Brazilian Journal of Medical Research,* **31:** 601-614, 1998.

————, "Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation", *Biochemistry Journal,* **348:** 1-13, 2000.

Pelham, H.R., "Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment", *EMBO J.,* **7:** 913-918, 1988.

Pelham, H.R.B., "The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum", *Trends Biochem. Sci.,* **15:** 483-486, 1990.

Plemper, R.K.; Bohmler, S.; Bordallo, J; Sommer, T. y Wolf, D.H., "Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation", *Nature,* **388:** 891-895, 1997.

Powers, J. y Barlowe, C., "Transport of ax12p depends on erv14p, an ER-vesicle protein related to the *Drosophila* cornichon gene product", *J. Cell Biol.,* **142:** 1209-1222, 1998.

Puig, A.; Lyles, M.M.; Noiva, R. y Gilbert, H.F., "The role of the thiol/disulfide centers and peptide binding site in the chaperone and ant-chaperone activities of protein disulfide isomerase", *J. Biol. Chem.,* **269:** 19128-19135, 1994.

Quizzine, M.; Magdalou, J.; Burchell, B. y Fournel-Gigleux, "Expression of a functionally active human hepatic UGT1A6 lacking the N-terminal signal sequience in the ER", *FEBS Lett.,* **454:** 187-191, 1999.

Rapoport, T.A.; Jungnickel, B. y Kutay, U., "Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum in bacterial inner membranes", *Annu. Rev. Biochem.,* **65:** 271-303, 1996.

Romisch, K., "Surfing the Sec61 channel: bi-directional protein translocation across the ER membrane", *J. Cell Sci.,* **112:** 4185-4191, 1999.

Sabatini, D.D.; Kreibich, G.; Morioto, T. y Adesnik, M., "Mechanism for the incorporation of proteins in membranes and organelles", *J. Cell Biol.,* **92:** 1-22, 1982.

Sanders, S.L.; Whitfield, K.M.; Vogel, J.P.; Rose, M.D. y Schekman, R.W., "Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER", *Cell,* **69:** 353-365, 1992.

Sanford, L.; Palay, M.D. y Palade, G.E., "The fine structure of neurons", *Journal of Biophysic and Biochemical Cytology,* **88:** 69-88, 1955.

Savitz, A.J. y Meyer, D.I., "Identification of a ribosome receptor in the rough endoplasmic reticulum", *Nature,* **346:** 540-544, 1990.

Schimmoller, F.; Singer-Kruger, B.; Schroder, S.; Kruger, U.; Barlowe, C. y Riezman, H., "The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi", *EMBO J.,* **14:** 1329-1339, 1995.

Segal, M.S.; Bye, J.M.; Sambrook, J.F. y Gething, M.J., "Disulfide bond formation during the folding of influenza virus hemagglutinin", *J. Cell Biol.,* **118:** 227-244, 1992.

Simon, S.M.; Peskin, C.S. y Oster, G.F., "What drives the translocation of proteins?", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **89:** 3770-3774, 1992.

Smith, C.A. y Wood, E.J., *Cell Biology,* 2a, ed., Chapman y Hall, Nueva York, 1996.

Tazawa, S.; Unuma, M.; Tondokoro, N.; Asano, Y.; Ohsumi, T.; Ichimura, T. y Sugano, H., "Identification of a membrane protein responsible for ribosome binding in rough microsomal membranes**",** *J. Biochem.,* Tokio, **109:** 89-98, 1991.

Terasaki, M., "Dynamics of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus during early sea urchin development", *Molecular Biology of the Cell,* **11:** 897-914, 2000.

Van Meer, G., "Cellular organelles: how lipids get there and back", *Trends in Cell Biology,* **10:** 550-551, 2000.

Vogel, J.P.; Misra, L.M. y Rose, M.D., "Loss of BiP/Grp78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast", *J. Cell Biol.,* **110:** 1885-1895, 1990.

Voigt, S.; Jungnickel, B.; Hartmann, E. y Rapoport, T.A., "Signal sequence dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane", *J. Cell Biol.,* **134:** 25-35, 1996.

Walter, P. y Johnson, A.E., "Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane", *Annu. Rev. Cell Biol.,* **10:** 87-119, 1994.

Waterman-Storer, C.M. y Salmon, E.D., "Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells", *Current Biology,* **8:** 798-806, 1998.

Werch-Reichart, D.; Hehn, A. y Didierjean, L., "Cytochrome P450 for engineering herbicide tolerance", *Trends in Plant Science,* **5(3):** 116-123, 2000.

Werner, E.D.; Brodsky, J.L. y McCracken, A.A., "Proteosome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **93:** 113797-113801, 1996.

Wiedmann, B.; Sakai, H.; Davis, T.A. y Wiedmann, M., *Nature,* **370:** 434-440, 1994.

Wiertz, E.J.; Jones, T.R.; Sun, L.; Bogyo, M.; Geuze, H.J. y Ploegh, H.L., "The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol", *Cell,* **84:** 769-779, 1996a.

———; Tortorella, D.; Bogyo, M.; Yu, J.; Mothes, W.; Jones, T.R.; Rapoport, T.A. y Ploegh, H.L., "Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteosome for destruction", *Nature,* **384:** 432-438, 1996b.

Wundt, W.M., *Principles of Physiological Psychology:* (*Edward Bradford Titchener, Trans*). Christopher D. Green York University, Toronto, Ontario, 1902. http://psychclassics.yorku.ca/wundt/Physio/index.htm (15 de marzo de 2001).

Yu, Y.H.; Sabatini, D.D. y Kreibich, G., "Antiribophorin antibodies inhibit the targeting to the ER membrane of ribosomes containing nascent secretory polypeptides", *J. Cell Biol.,* **111:** 1335-1342, 1990.

CAPÍTULO 15

EL APARATO DE GOLGI

Gabriel López Velázquez ■ Angélica González Oliver
Miguel Ángel Alcántara Ortigoza ■ Joel Armando Vázquez Pérez
Rocío George Téllez ■ Luis Felipe Jiménez García



Reseña histórica y función del aparato de Golgi

Las células eucariontes muestran un grado superlativo de organización macromolecular. Los diferentes procesos metabólicos son compartamentalizados en distintos organelos celulares, los cuales actúan coordinadamente para sostener dichos procesos. El aparato de Golgi (AG) es un organelo celular endomembranoso presente en todas las células con núcleo, desde las más antiguas (por ejemplo, *Giardia lamblia*) hasta los eucariontes superiores (por ejemplo, humano).

El AG sin teñir no es visible, ya que su índice de refracción es similar al del citoplasma. Fue visto por primera vez por La Valette Saint Georges en 1865 al estudiar espermatocitos; sin embargo, fue un italiano, Camilo Golgi, quien lo describió en 1889 como un "aparato reticular interno" en células de Purkinje del cerebelo de búho. En 1914, Santiago Ramón y Cajal le dio el nombre de aparato de Golgi en reconocimiento a su descubridor.

> Camilo Golgi, describió en 1889 un "aparato reticular interno" en células de Purkinje del cerebelo de búho.

En 1923, Nassonov presentó la primera evidencia del papel fundamental del AG en la función secretora de la porción exocrina del páncreas. Este investigador mostró que las secreciones se encontraban primero sobre el AG y finalmente sobre el ápice celular. En forma similar, Bowen en 1929 adjudicó al AG una importante participación en la formación del acrosoma del espermatozoide. Dalton en 1952 logra visualizar este organelo por microscopia óptica de contraste de fases. En 1956 acuña el término de complejo para describir al organelo compuesto de lamelas, vesículas y vacuolas.

La función de este organelo está relacionada con la adición de moléculas de azúcar a los péptidos en tránsito (glicosilación) para la formación de glicoproteínas; algunas de éstas pueden a veces terminar como proteínas integrales de membrana, otras pueden moverse a través del AG y dirigirse a lisosomas o ser secretadas por exocitosis (como por ejemplo, las enzimas digestivas). También participa en la biosíntesis de polisacáridos, en la formación de pared celular en vegetales, en la renovación de membranas y en la realización de otras modificaciones postraduccionales. El AG participa también

> La función de este organelo está relacionada con la adición de moléculas de azúcar a los péptidos en tránsito (glicosilación) para la formación de glicoproteínas.

activamente en el ensamblaje de diversas envolturas de adenovirus y herpesvirus.

Dependiendo del estado fisiológico de la célula, el AG se ve sujeto a cambios de configuración, tamaño y posición. El mal funcionamiento, ya sea en las modificaciones postraduccionales, en la clasificación y/o en el transporte de las glicoproteínas, conduce a la disrupción de la homeostasis celular. Es claro, en el caso de los humanos, que esto puede verse reflejado en el desarrollo de enfermedades y síndromes.

La aplicación de técnicas de biología molecular ha permitido realizar la disección de diferentes genes que participan en la organización y metabolismo del AG (proteínas COP, clatrinas, receptores, bombas de protones, proteínas Rab/Sec, etc.). Por otra parte, se cuenta con modelos celulares para el estudio del AG, incluidos ovocitos de anfibios (*Xenopus laevis*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y diversas líneas celulares especializadas en la secreción de macromoléculas, tales como las células pancreáticas, hepatocitos, células nerviosas, etc. Estas herramientas de estudio han permitido avanzar a grandes pasos en el conocimiento de los procesos básicos y reguladores del AG y sientan las bases para nuevas estrategias de estudio.



El aparato de Golgi en eucariontes ancestrales

Todas las células tienen que interactuar con su entorno de una u otra manera. Una forma de hacerlo es mediante la liberación o secreción de moléculas proteicas que sirven como señales o que participan en la modificación del medio. La secreción de proteínas en células procariontes es mediada directamente por la membrana plasmática, ya sea por translocación dependiente de una partícula reconocedora de señales, o por el sistema *sec*, específico de procariontes. En el caso de las células eucariontes, se ha desarrollado a través de la evolución un complejo sistema de compartimentos y vesículas membranosas denominado AG.

Las células eucariontes ya extintas usaban principalmente sistemas de recuperación de proteínas de exportación en su vía secretora. Esto incluía el reciclado de proteínas entre dos compartimentos membranosos adyacentes; tal situación podría ser la clave para el entendimiento de la evolución del compartimento del AG. La individualidad bioquímica entre dos sistemas de membranas (es decir, núcleo/retículo endoplásmico y membrana plasmática) no puede ser completa si se da un transporte vesicular directo entre ambos, ni si la recuperación de proteínas es el mecanismo más importante de transporte de las mismas. Un compartimento adicional intercalado entre el retículo endoplásmico pudo haber ayudado a mantener la diferencia en composición de lípidos de los diferentes compartimentos como se observa hoy en día.

Los modelos actuales de evolución de los sistemas de endomembranas asumen que hubo una evolución secuencial de los pasos del transporte vesicular. Estos modelos se apoyan en la hipótesis de que todos los tipos de vesículas cubiertas evolucionaron de un ancestro común. Una

vez que fue formado un compartimento parecido al AG, los diferentes grupos de protistas y sus descendientes optimizaron este sistema básico para sus propios requerimientos. Esto podría explicar la variabilidad de los AG descritos a partir de los grupos más antiguos y hasta los más evolucionados.

Diplomonadida y Trichomonadida. Estos grupos son considerados ancestrales a todos los eucariontes debido a que sus características metabólicas, morfológicas y moleculares los sitúan dentro de las ramas que más tempranamente derivaron en la historia evolutiva de las células con núcleo. En el grupo de los Diplomonadida, característicamente representado por *Giardia lamblia*, no se puede distinguir un AG ni vesículas recubiertas típicas. En un principio se creyó que *G. lamblia* no poseía AG, pero los estudios en células a las que se les indujo artificialmente enquistamiento, mostraron arreglos de membranas lisas y paralelas (cisternas de Golgi) que presentaron actividad de fosfatasa ácida. Estudios posteriores demostraron la presencia de estas cisternas en trofozoitos (figura 15-1), además de vesículas recubiertas de entre 50 a 80 nm de diámetro. El uso de técnicas de criosustitución ha permitido demostrar la presencia de cisternas típicas del AG en posición perinuclear de ambos núcleos en trofozoitos de *G. lamblia*.

No se sabe mucho acerca de la maquinaria molecular en la ruta secretora de *G. lamblia*. A pesar de esto, se ha encontrado el gen de ARF, que complementa parcialmente la función de ARF en cepas carentes de este gen en *S. cerevisiae*. Acorde a estos datos, la brefeldina A impide la secreción de antígenos de superficie tanto en los quistes como en trofozoitos. Por inmunofluorescencia se han localizado homólogos de β-COP asociadas a membrana, las cuales desaparecen con tratamiento de brefeldina A. También se ha detectado el gen de la proteína de unión a retículo endoplásmico (BiP) y estudios recientes han demostrado la presencia del receptor a la partícula

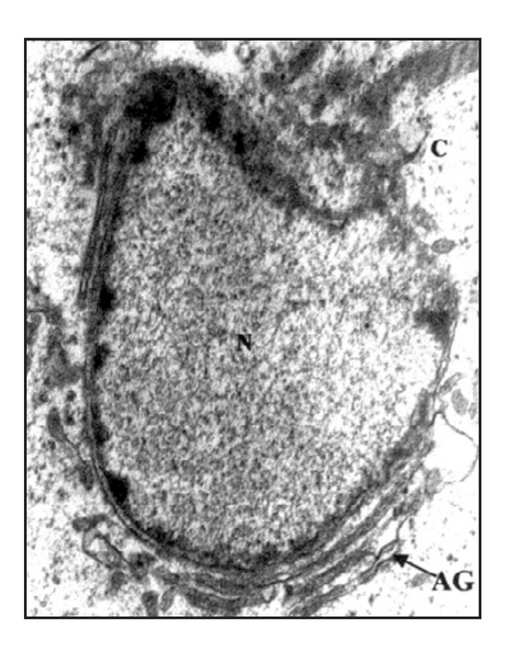


Figura 15-1. Trofozoitos de *G. lamblia*. Se observa un sistema de cisternas y vesículas perinucleares que representan el AG. **N**, núcleo; **AG**, aparato de Golgi; **C**, citoplasma.

reconocedora del péptido señal (SRP) en *G. lamblia*. Estos datos en conjunto muestran que la ruta secretora de estos organismos es mucho más compleja y parecida a la del resto de los eucariontes de lo que se pensaba anteriormente.

Tritrichomonas foetus posee un AG bien desarrollado que consiste en cisternas alargadas y empaquetadas de manera compacta. Las regiones terminales de cada cisterna se encuentran dilatadas de manera ostensible. El AG se localiza en la porción anterior de la célula, estrechamente asociado con los filamentos parabasales. El uso de fijaciones con glutaraldehído, junto con la aplicación de ácido tánico, revelan puentes de comunicación entre sus cisternas. En aislados por fraccionamiento celular, se registra una alta actividad de galactosil-transferasa en la fracción correspondiente al AG. Se han identificado 15 polipéptidos de entre 15 a 116 kDa que parecen corresponder a enzimas residentes del AG previamente descritas en mamíferos.

Al igual que en *G. lamblia*, se creía que *Entamoeba* no poseía AG; sin embargo, gracias a que en estado de enquistamiento estos organismos producen grandes cantidades de quitinasas, es posible distinguir una gran cantidad de vesículas secretoras. Ahora se sabe que existe un sistema membranoso que representa el AG en este organismo. Aunque la amiba no tiene propiamente un sistema de cisternas de Golgi, se han identificado estructuras tipo Golgi por microscopia confocal con NBD-ceramida y usando tiamino-pirofosfatasa para su localización mediante microscopia electrónica de transmisión.

Se sabe de la existencia del gen para el receptor de ERD2, una proteína transmembranal residente de *cis*-Golgi. También se han identificado los genes que codifican para ARF en *E. histolytica* y *E. invadens*. Las secuencias aminoaciles predichas conservan perfectamente el dominio de unión a guanina, incluyendo el *loop* de unión a pirofosfato (GLDAAGKT). También presentan la región de *switch* (DVGG) y el motivo de reconocimiento de guanina (NKQD) como el resto de los ARF descritos. Aunado a todo esto, se sabe que la brefeldina A y el ácido okadoico desensamblan el AG de las amibas e incluso interrumpen el proceso de enquistamiento.

Tripanosomátidos. Los tripanosomátidos, que incluyen géneros como *Trypanosoma* y *Leishmania*, al igual que los euglenoides, poseen un AG bastante desarrollado y evidente, que presenta las cisternas características del AG (de cuatro a seis cisternas) en posición perinuclear (figura 15-2). Cercano a la cara *trans*-Golgi existe un prominente sistema de cisternas aplanadas y de elementos tubovesiculares, los cuales se han sugerido como homólogos de la RTG de mamíferos.

Existe un amplio compendio de datos acerca de la maquinaria molecular de la vía secretora de estos organismos y, dependiendo de la especie, tienen características distintivas. Así, por ejemplo, se han clonado y secuenciado los genes para una galactofuranosil-transferasa específica de la biosíntesis de los lipofosfoglicanos, así como de una proteína requerida para la compartamentalización intracelular de la biogénesis de los lipofosfoglicanos en *Leishmania*. También se han secuenciado los genes homólogos de la *N*-acetilglucosaminil-fosfato-transferasa y de la BiP de mamíferos. Las vesículas

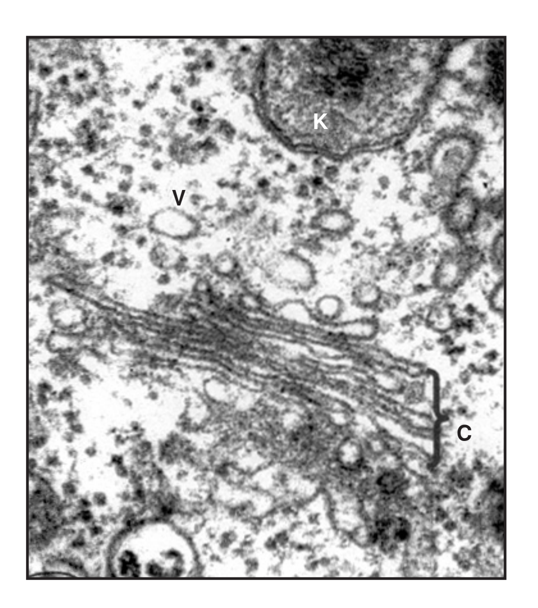


Figura 15-2. Epimastigote de *T. cruzi*. Se observa un AG bastante desarrollado, con una serie de cisternas y redes *trans*- y *cis*-Golgi. **V**, vesícula; **C**, cisternas; **K**, cinetoplasto.

secretoras de *T. brucei* presentan una cubierta formada por un polipéptido de 180 kDa, el cual puede representar a la clatrina. También en *T. brucei* se encuentran oligosacáridos con unidades de α-galactosa o extensiones de poli-*N*-acetilgalactosamina en posición terminal, pero no se encuentran unidades de ácido siálico. En *T. cruzi* se han descrito oligosacáridos que tienen unidos α-galactosa, fucosa y ácido siálico. En este parásito, la adición de unidades de ácido siálico a glicoproteínas y glicolípidos es mediada por una *trans*-sialidasa localizada en la superficie externa del parásito y no por una CMP-sialil ácido-dependiente sialiltransferasa intracelular como en mamíferos.

Morfología del aparato de Golgi

El AG se encuentra generalmente localizado cerca del núcleo celular y en células animales cercano a los centrosomas. Está formado por diminutos sáculos envueltos por una membrana, aplanados y apilados a modo de platos. Cada sáculo se denomina cisterna, las cisternas suelen medir alrededor de una micra de diámetro. Como el resto de las membranas celulares, la que forma a las cisternas consta de una bicapa fosfolipídica con gran variedad de proteínas transmembranales. En cualquier circunstancia, salvo cuando la célula está en división, las cisternas mantienen su disposición apilada característica (figura 15-3).

El número de cisternas apiladas del AG varía dependiendo del tipo celular. Algunas células animales contienen un apilamiento grande que puede estar interconectado; generalmente se presentan cinco o seis cisternas, mientras que en ciertas células de plantas puede haber cientos de pequeños apilamientos denominados dictiosomas. En células de plantas y organismos inferiores, estos apilamientos presentan a menudo 20 o más cisternas.

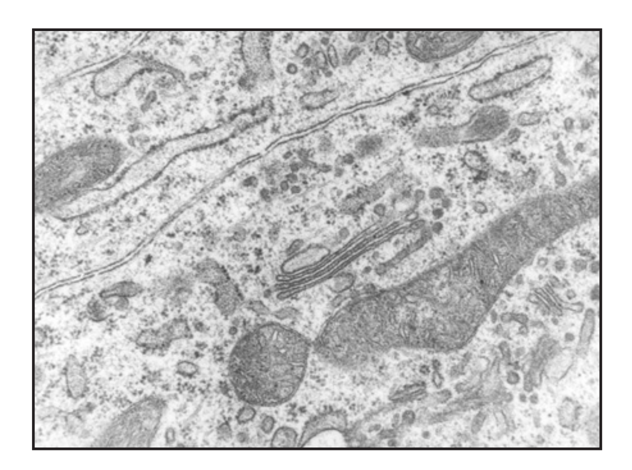


Figura 15-3. Cisternas apiladas y elementos tubo-vesiculares del aparato de Golgi.

El AG muestra una organización polarizada, por lo que presenta dos caras: la cara *cis* (generalmente convexa) está orientada hacia el retículo endoplásmico y recibe las proteínas de exportación y la cara *trans* está orientada hacia los gránulos secretorios.

La cisterna más cercana al retículo endoplásmico es generalmente fenestrada y presenta continuidad con la red *cis*-Golgi (RCG).

En la región *trans,* el AG se extiende y forma una red de estructuras tubovesiculares conocida como red *trans*-Golgi (RTG).

El AG muestra una organización polarizada, por lo que presenta dos caras: la cara *cis* (generalmente convexa) está orientada hacia el retículo endoplásmico y recibe las proteínas de exportación, y la cara *trans* está orientada hacia los gránulos secretorios o los centriolos. Entre ambas regiones *cis* y *trans* existen cisternas centrales o medias que pueden variar en número. La cisterna más cercana al retículo endoplásmico es generalmente fenestrada y presenta continuidad con la red *cis*-Golgi (RCG), en forma de vesículas y túbulos, constituyendo el compartimento inmediato al retículo endoplásmico y teniendo un intercambio de proteínas con éste. En la región *trans,* el AG se extiende y forma una red de estructuras tubovesiculares conocida como red *trans*-Golgi (RTG); esta RTG puede estar formada por redes de túbulos membranosos, por una red tubular residual pequeña o por túbulos ramificados (figuras 15-3 y 15-6).

Por la RTG pasan las proteínas de exportación antes de alcanzar su destino final. Una de las funciones escenciales de la RTG es empaquetar las proteínas dentro de diferentes tipos de vesículas de transporte, las cuales pueden ser dirigidas hacia los compartimentos prelisosomal y lisosomal, hacia los gránulos secretorios o a diferentes dominios de la membrana plasmática.

Las cisternas *cis*, *media* y *trans* representan una serie de subcompartimentos enriquecidos con enzimas específicas que llevan a cabo modificaciones postraduccionales a proteínas recién sintetizadas. Por la región *cis* del conjunto entran las proteínas recién fabricadas. A medida que atraviesan el apilamiento, van modificándose químicamente, de acuerdo con el destino que les corresponde. Al salir por la región *trans*, se agrupan según sus características y se envían a diferentes destinos. La caracterización morfológica del AG se apoya en la localización de enzimas específicas en las diferentes regiones del mismo (figura 15-6).

Biogénesis del aparato de Golgi

A través de las fases del ciclo celular, el AG sufre cambios en su morfología, localización y función. Durante la interfase presenta una organización ca-

racterística en cisternas paralelas yuxtapuestas a la red *trans* y se localiza en la vecindad de los centriolos. Durante la profase, la actividad del AG decrece y éste se disgrega en múltiples estructuras tipo vesicular, las cuales se separan del área que contiene el huso mitótico y adoptan una distribución perinuclear. Estas vesículas, derivadas de la fragmentación completa del organelo, generan cúmulos de hasta 300 vesículas de diversos diámetros, las cuales contienen marcadores propios del AG. Durante la telofase, el proceso de disgregación se revierte y se reactiva el tráfico vesicular; la reconstrucción del organelo se inicia durante la citocinesis, antes de la separación de las dos células hijas.

A partir de estudios con células HeLa y proteínas quiméricas GFP *(green fluorescent protein)* galactosil-transferasa, se sugiere que las proteínas del AG durante la mitosis no se restringen a las vesículas propias de éste, sino que se difunden a compartimentos membranosos como el retículo endoplásmico.

A pesar de la obvia transformación morfológica de las pilas interfásicas del AG hacia las estructuras tubulovesiculares durante la mitosis, la polaridad *cis-trans* de las proteínas residentes del AG permanece en los cúmulos mitóticos. Se propone que estos cúmulos son la unidad hereditaria del AG durante la mitosis.



Transporte vesicular en el aparato de Golgi

Desde los estudios realizados por Palade en 1975, en los que demuestra que los gránulos de cimógeno son los transportadores de proteínas secretoras, se postula que el transporte de macromoléculas entre compartimentos membranosos es mediado por la formación y fusión de vesículas. Ahora sabemos que el transporte de proteínas entre diferentes organelos o compartimentos se realiza a través de la ruta secretora y/o endocítica. Ambas rutas pueden ser mediadas por pequeñas vesículas que geman desde un compartimento membranoso (compartimento donador), que es el que produce las vesículas de transporte para fusionarse con el compartimento blanco (compartimento aceptor) que recibe a la vesícula y su contenido. El paso secuencial de las proteínas a través de las cisternas del AG fue demostrado por primera vez con estudios de inmunolocalización ultraestructural en células infectadas por virus.

El transporte vesicular entre membranas adyacentes es controlado al menos en cuatro puntos: i) en la clasificación de la proteína, ii) formación y transporte de la vesícula; iii) liberación de la proteína a la membrana donadora, y iv) reciclado de la maquinaria de transporte hacia la membrana donadora.

Gemación de vesículas

Un punto importante de control del transporte vesicular es la gemación. Para que se lleve a cabo la formación de una vesícula, se requiere de la par-

Para que se lleve a cabo la formación de una vesícula, se requiere de la participación de una serie de proteínas de recubrimiento.

ticipación de una serie de proteínas de recubrimiento. Esta cubierta es utilizada como un medio mecánico para que las vesículas puedan gemar y dirigirse hacia su destino. Se han caracterizado cuatro tipos de cubiertas: dos de clatrina, que participan en endocitosis mediada por receptor y en el transporte de proteínas lisosomales y vacuolares en la red *trans*-Golgi, y dos de coatómeros (COP), las cuales están involucradas en el transporte entre RE y AG (tabla 15-1). Ambos tipos de complejos proteicos de cubierta interactúan con las colas citoplásmicas de proteínas de membrana en secuencias aminoaciles específicas.

Tabla15-1. Tipos de cubierta vesicular.

Tipo de cubierta	Subunidades de la cubierta	GTPasa	Origen-destino
Clatrina AP-1	Clatrina, adaptador 1	ARF	RTG-prelisosomas
Clatrina AP-2	Clatrina, adaptador 2	ARF?	Membrana plasmática-endosomas
COPI	Coatómero	ARF	RE-AG; bidireccional dentro de AG; AG-RE
COPII	Proteínas COPII	Sar1	RE-AG

Las proteínas de recubrimiento son de forma esférica y están formadas por múltiples subunidades, similares entre sí, que van de los 50 a los 100 nm de diámetro. Las subunidades se dirigen desde el citosol hacia la región de la membrana en donde se encuentra en proceso la formación de una vesícula. Una enzima guanosín-trifosfatasa (GTPasa) controla el proceso de gemación (en el caso de la COPI es la proteína ARF y la Sar para la COPII). El GTP dirige el ensamblaje de la cubierta, mientras que el GDP promueve el desensamblaje de la misma. El intercambio de GTP por GDP es catalizado por una enzima localizada en la cisterna donadora; lo anterior da como resultado la formación de las moléculas ARF[GTP] o Sar[GTP] que se unen a la membrana, la cual permanece aplanada. En el siguiente paso, las subunidades de recubrimiento que se encontraban en el citosol se unen a la membrana que tiene unidas las moléculas de ARF[GTP] o Sar[GTP] y se ensamblan para formar una cubierta esférica, produciendo la gemación de las vesículas. Después de la gemación, el GTP que estaba unido es hidrolizado, causando que ARF o Sar se liberen y quede una cubierta inestable, la cual puede desensamblarse o seguir el proceso de transporte.

Coatómeros

Cuando la reacción de transporte es inhibida por incubación de membranas de AG con citosol y un análogo de GTP no hidrolizable (GTP-γ-S), se forman vesículas cubiertas de ocho polipéptidos. Siete de estos polipéptidos son proteínas llamadas COP (α, 160 kD; β, 110 kD; β', 102 kD; γ, 98 kD; δ, 61 kD; ε, 31 kD y ζ, 20 kD) y proteínas enlazadoras de GTP (GTPasa), ARF y Sar, las cuales se encuentran asociadas equimolarmente formando una cubierta denominada coatómero.

El papel esencial del coatómero y el ARF en el transporte de proteínas *in vivo* es apoyado por diferentes estudios genéticos. En levaduras se han obtenido los genes de varias subunidades del coatómero y del ARF. Mutaciones que anulan cualquiera de las subunidades del coatómero o dos de las isoenzimas del ARF son letales y bloquean el transporte de proteínas. También mutaciones sensibles a la temperatura en la subunidad β' y la subunidad γ muestran defectos en el transporte y en células de mamíferos una mutación que afecta la subunidad ε resulta en defectos en la estabilidad y el transporte del AG. Otros datos sugieren que el principal papel del coatómero puede ser el de manejar la formación del transporte vesicular retrógrado.

Por otra parte, también en levaduras se ha detectado otro tipo de proteínas involucradas en la gemación de vesículas de 60 nm (Sec12, Sec13, Sec16 y Sec23), las cuales son requeridas para el transporte entre RE y AG. Las proteínas Sec purificadas requeridas para la gemación de las vesículas comprenden 5 subunidades, Sar1p y dos complejos heterodiméricos (Sec23p-Sec24p y Sec13p-Sec31p). Además, una glicoproteína de membrana Sec12p permanece en RE, la cual guía la vesícula al compartimento adecuado. El sitio y aspectos claves de la gemación son regulados por enlace e hidrólisis de GTP. Sar1 es atraído a la membrana del RE por interacción del dominio NH_2 citoplásmico de Sec12p; este dominio es un factor de disociación de nucleótidos específico de Sar1p que promueve el intercambio de difosfato de guanosina (GDP) por GTP, dejando que la forma activa de Sar1 se enlace a la membrana del RE. Entonces Sar1 recluta los complejos Sec23p y Sec13p para producir las vesículas de transporte.

Tráfico entre RE y AG. Transporte anterógrado y retrógrado

Existe un tipo de transporte denominado anterógrado, el cual se lleva a cabo a través de pequeñas vesículas que geman desde la cisterna donadora para fusionarse con la aceptora y permitir así la progresiva glicosilación de las proteínas hasta llegar a la RTG. Este tipo de transporte comprende 3 etapas: la primera se lleva a cabo desde el retículo endoplásmico hasta el AG; esta etapa ha sido muy bien caracterizada en levaduras; la gemación de vesículas desde el RE involucra a un número de proteínas de membrana periféricas, llamadas cubierta COPII, y al menos una proteína de membrana integral Sec12p que activa la cubierta de ensamble, pero no necesariamente debe ser un componente de las vesículas. La segunda etapa consiste en el transporte desde el compartimento *cis* a la región media Golgi. Finalmente, la tercera etapa es desde los compartimentos medios a la RTG.

El transporte denominado anterógrado, se lleva a cabo a través de pequeñas vesículas que geman desde la cisterna donadora para fusionarse con la aceptora.

El mantenimiento de las membranas del RE requiere de un flujo retrógrado de los componentes de membrana para compensar el movimiento anterógrado; a este tipo de flujo se le denomina transporte retrógrado, el cual se lleva a cabo desde el AG hasta el RE, permitiendo la recuperación de sus

El transporte retrógrado, se lleva a cabo desde el AG hasta el RE.

proteínas residentes; un ensayo de enlace muestra que las subunidades α y β' del coatómero enlazan a dichas secuencias de recuperación en una proteína quimérica.

Existen al menos dos tipos de señales que permiten la localización de dichas proteínas. La primera es llamada señal de retención, la cual permite a las proteínas alcanzar el sitio correcto de localización, evitando el movimiento hacia adelante y el acceso hacia las vesículas de la vía anterógrada. La segunda es llamada señal de recuperación y actúa una vez que la proteína ha dejado el compartimento donde reside. El mecanismo de transporte retrógrado ha sido controversial; algunos trabajos basados en el uso de la brefeldina A sugieren que no es mediado por vesículas, sino por intermediarios vesiculotubulares denominados ERGIC (por sus siglas en inglés de compartimento intermedio RE-AG), IC (compartimento intermedio) o VTC (agregados tubulovesiculares) (figura 15-4).

Una de las señales de recuperación más estudiada entre el AG y RE es el tetrapéptido KDEL, ubicado en el carboxilo-terminal de la proteína. Esta secuencia se encuentra en muchas proteínas residentes del lumen del RE y la eliminación de la misma aumenta su secreción hacia afuera del RE. Cuando la señal es trasladada a proteínas no residentes, éstas son

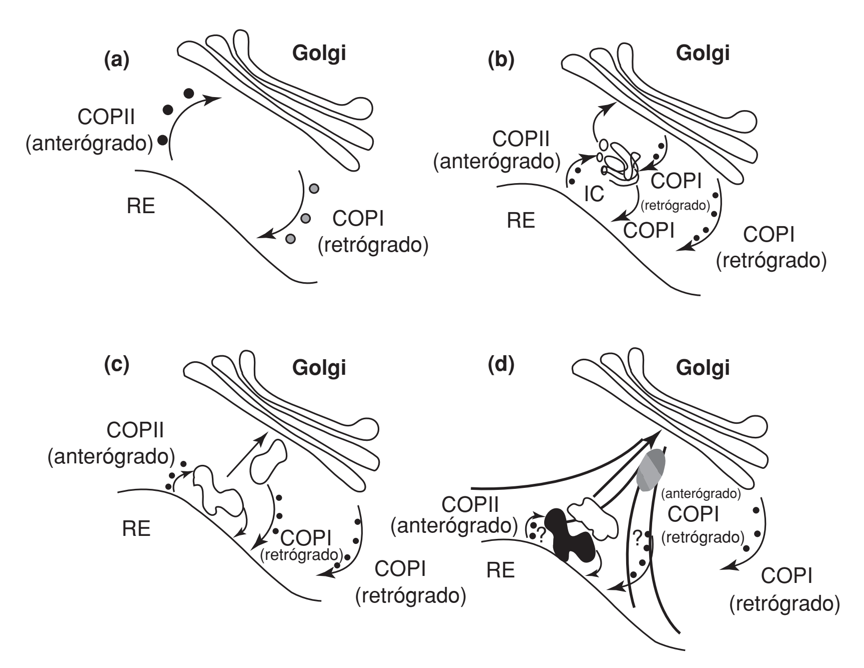


Figura 15-4. Diferentes modelos que describen el transporte entre RE y AG. **a)** Anterógrado, mediado por vesículas cubiertas con COPII y retrógrado, mediado por vesículas cubiertas por COPI. **b)** Existencia de una estructura membranosa denominada compartimento intermedio (IC) adicional a las vesículas COPI y II. **c)** Este modelo toma en cuenta datos recientes, los cuales demuestran que el IC, también conocido como VTC o ERGIC, funciona como intermediario en el transporte activamente y no como un compartimento estático. **d)** Este modelo resume datos experimentales en donde se esquematiza la participación de los microtúbulos, así como los posibles procesos de transporte.

situadas en el lumen del RE. Tales hallazgos han sugerido que las proteínas residentes en el RE escapan de este organelo y entran al AG donde son identificadas y devueltas. El receptor encargado de reconocer a la secuencia KDEL, llamado ERD2, fue identificado en levaduras y en mamíferos. Caracterizaciones bioquímicas de este receptor muestran que la unión con su ligando es específica y parece actuar en forma dependiente del pH. Se ha observado que el pH a través de la vía exocítica se va incrementando hacia la RTG, aumentando su afinidad del ERD2 a su ligando, regresándolo al RE. De esta forma, al regresar a un pH neutro libera su ligando en el lumen del RE.

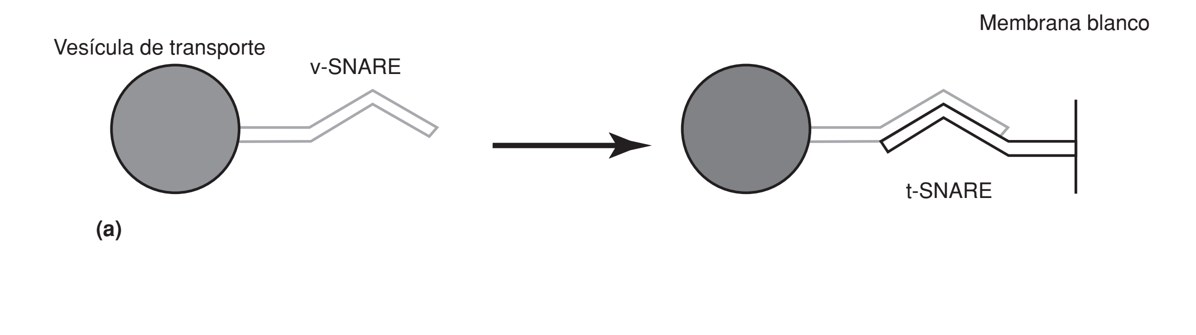
Además de la secuencia KDEL, hay otras señales de recuperación; por ejemplo, en proteínas residentes con una topología tipo I (amino terminal en el lumen), la señal consiste en dos lisinas KKXX (donde X es cualquier aminoácido), las cuales se encuentran en la parte carboxilo terminal. En proteínas tipo II (carboxilo-terminal en el lumen), la señal consiste en dos argininas (RR) que se encuentran en los primeros cinco residuos de la región amino terminal de la proteína.

Por otra parte existen evidencias de que la señal de recuperación lisina-lisina se une *in vitro* directamente con las proteínas de cubierta COPI y que las mutaciones en los genes que codifican estas proteínas afectan directamente a la recuperación de proteínas *in vivo*, sugiriendo que las vesículas cubiertas con COPI llevan proteínas de regreso al RE. Estos datos apoyan la teoría del transporte retrógrado mediado por vesículas.

Maduración y fusión de las vesículas

Los sitios en los que las vesículas van a adherirse y posteriormente a fusionarse requieren de identificadores tanto de la vesícula como del blanco específico al cual se dirige dicha vesícula. Existe un tipo de proteínas de membrana orientadas hacia el citoplasma, denominadas SNARE (de sus siglas en inglés, proteína de unión al receptor NSF soluble), que parecen tener la función de receptores v-SNARE y t-SNARS (receptores de SNAP de la vesícula y del blanco-específico, respectivamente). La interacción entre estos SNARE promueve el anclaje de la vesícula a la membrana aceptora. Existe una proteína de enlace, sensible a la *N*-etilmaleimida (NSF), que es necesaria en el transporte vesicular y en los procesos de fusión de membranas. La SNAP (una NSF soluble) enlaza el complejo SNARE e inicia la fusión cuando el NSF hidroliza ATP. Estudios *in vitro* han demostrado que NSF es un tetrámero de 76 kDa; si se elimina a NSF, se provoca la acumulación de vesículas no cubiertas y se detiene el proceso de fusión; por lo anterior, se ha propuesto un modelo de anclaje-fusión de las vesículas denominado hipótesis SNARE (figura 15-5).

El uso de inhibidores ha llevado a la identificación de diferentes estados de maduración de las vesículas. El transporte es bloqueado por análogos del GTP no hidrolizables como GTP-γ, el cual detiene la función de la membra-



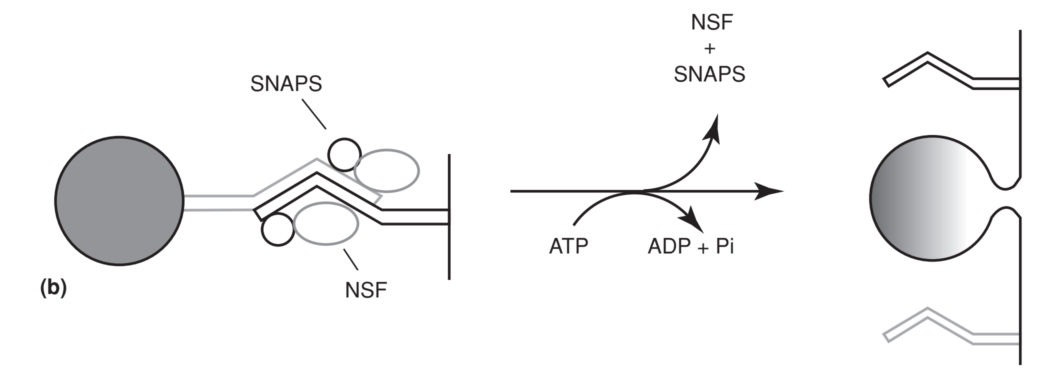


Figura 15-5. Hipótesis SNARE. **a)** Cada vesícula de transporte se encuentra enlazada con una o más v-SNARE, la cual se aparea con una t-SNARE, provocando, por lo tanto, la fusión de la vesícula de transporte con la membrana blanco correcta. **b)** La maquinaria general de fusión consiste en proteínas citoplásmicas, incluidas ATPasas, NSF y proteínas SNAP. Las SNAPS (de las cuales por lo menos hay tres subtipos) se enlazan a la SNARE (receptor de la SNAP), habilitando la unión del NSF. La hidrólisis del ATP por NSF es esencial para la maquinaria, conduciendo a la fusión de la bicapa. (Modificada de Pierre Marie Lledo.)

na aceptora del AG, pero no de la membrana donadora, por lo que bloquea la etapa que corresponde al procesamiento de las vesículas de fusión, pero no al proceso de fusión por sí mismo. La inhibición con GTP-γ–S requiere de un factor citosólico como cofactor que se une a las membranas del AG durante la inhibición.

El transporte también es bloqueado con bajas concentraciones de *N*-etilmaleimida (NEM), la cual es una proteína periférica asociada a las membranas del AG y que puede ser liberada con ATP y sales. La microscopia electrónica muestra que ambos tratamientos provocan la acumulación de vesículas de 70 nm de diámetro con proteínas de exportación. Como se mencionó previamente, las vesículas deben perder su cubierta para poder adherirse y fusionarse con la cisterna receptora. Basándonos en estos datos, podemos sugerir que la hidrólisis del GTP desempeña un papel importante en la pérdida de la cubierta de las vesículas. Utilizando un razonamiento similar, al aplicar el NEM se observa una acumulación de vesículas en la cisterna del AG, lo cual indica que se requiere una proteína sensible a NEM para que se lleve a cabo la fusión de membranas.

Métodos de estudio para el transporte vesicular

Para poder analizar el transporte de vesículas, su transferencia y fusión con los compartimentos blancos, se han utilizado sistemas libres de células. La proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) se usa como un modelo porque esta proteína es sintetizada en grandes cantidades en células infectadas con VSV en donde es transportada a lo largo de la ruta secretora hasta la membrana plasmática de la misma forma en que ocurre con las proteínas en células normales.

El fármaco brefeldina A se utiliza comúnmente para el estudio de la estructura y función del AG. Este compuesto es una lactona heterocíclica sintetizada a partir del palmitato y producida por el hongo *Penicillium brefeldianum*. Esta droga es un poderoso inhibidor del transporte entre RE y AG y del transporte anterógrado entre cisternas. El tratamiento de células con esta droga conduce al desensamblaje del aparato de Golgi, a la inhibición del transporte retrógrado dependiente de microtúbulos e inhibe la unión del factor de ribosilación de ADP (ARF). Existen otros compuestos de uso similar, como el fluoruro de aluminio (AlF_4) que inactiva las subunidades Gα de las proteínas que unen GTP (ARF), inhibiendo el transporte de las vesículas pero no el ensamblaje del coatómero. Las toxinas bacterianas de *Vibrio cholerae* y *Bordetella pertussis* también se han usado; la primera tiene un efecto parecido al del $A1F_4$ y la segunda tiene un efecto negativo sobre los factores inhibidores de ARF, produciendo así una inhibición del transporte vesicular. La bafilomicina y la concanamicina son antibióticos altamente específicos que inhiben a las ATPasas vacuolares de protones. Estas ATPasas son las encargadas de regular el pH del lumen del AG, el cual se ha sugerido que es un factor importante para asegurar la fidelidad del transporte vesicular.

El fármaco brefeldina A se utiliza comúnmente para el estudio de la estructura y función del AG.

Finalmente, dos compuestos más son también usados, la ilimaquinona y la megalomicina. La primera causa el rompimiento del AG en pequeñas vesículas, permitiendo el transporte anterógrado hasta la región *cis*-Golgi, pero no más allá. La segunda es un antibiótico con amplio espectro antibacterial y actividad antiviral; es capaz de inhibir los últimos pasos del procesamiento de las glicoproteínas, afectando así el transporte *intra*-Golgi.



Modificaciones postraduccionales

Glicosilación

Aquellas proteínas que están destinadas a ser secretadas, para incorporarse en la membrana citoplasmática o a organelos membranosos, contienen oligosacáridos y son denominadas glicoproteínas. Este proceso denominado glicosilación es indispensable para la clasificación y correcta ubicación de estas proteínas en el compartimento celular que les corresponde. Los oligosacáridos que forman parte de las glicoproteínas son de dos cla-

Aquellas proteínas que están destinadas a ser secretadas, para incorporarse en la membrana citoplasmática o a organelos membranosos, contienen oligosacáridos y son denominadas glicoproteínas.

Los oligosacáridos que forman parte de las glicoproteínas son de dos clases, por unión-*N* o por unión-*O*.

ses, dependiendo del tipo de unión con que se adicionan a las mismas. La adición puede ser por unión-*N* o por unión-*O*.

La asociación de oligosacáridos a *N*-asparagina requiere de una acción secuencial de enzimas localizadas en diferentes regiones del AG (figura 15-6): La α-1,2-manosidasa (Mann I) continúa el arreglo de los residuos de manosa iniciado en el RE, se deja un núcleo de pentomanosas al cual se agrega *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) por la *N*-acetilglucosaminotransferasa I (NAGT I). La 1,3-1,6-manosidasa II (Mann II) remueve dos residuos extra de manosa, permitiendo la adición final de GlcNAc por la α-1,2-N-acetilglucosaminotransferasa II. Cada rama de la molécula puede ser elongada por la adición de galactosa por la β-1,4-galactosiltransferasa (GalT) y con ácido siálico por la α-2,6-sialiltransfersa (sialilT).

En general se acepta que el AG tiene una funcionalidad compartamentalizada, debido a que se han determinado procesos específicos en regiones determinadas. Las diferencias funcionales entre las subdivisiones *cis, media* y *trans* fueron descubiertas por la localización de las enzimas involucradas en la adición de oligosacáridos en diferentes regiones del AG (figura 15-6). Así, la eliminación de manosa ocurre en las regiones *cis y media*, la adición de *N*-acetilglucosamina ocurre en la región *media*, la adición de galactosa en la región *trans* y la adición de ácido siálico en la red *trans*-Golgi. Sin embargo, no es claro si cada proceso realizado por cada enzima diferente es completamente restrictivo a una cisterna en particular o si la distribución es gradauada a través de las cisternas, por lo que las enzimas de acción temprana estarían presentes principalmente en la cisterna *cis* y las enzimas de acción tardía en la región *trans*, sin exclusividad en los diferentes compartimentos. Es de hacer notar que las enzimas residentes del AG poseen dominios transmembranales que pueden estar uniéndolas a la membrana del AG, impidiéndoles ser liberadas y así formar dominios funcionales de glicosilación u otras modificaciones postraduccionales.

Existen estudios de inmunocitoquímica para localizar la distribución de la NAGT I y la Mann II que muestran que éstas se encuentran tanto en la región *media* como en la *trans*, sugiriendo que su ubicación no es específica, sino que se da un sobrelapamiento. No obstante, esto podría indicar quizá que las enzimas no sean funcionales independientemente de su localización en el AG. El estudio de la compartamentalización funcional de AG sigue en discusión y se necesitan más estudios para apoyarla.

> La *O*-glicosilación es la adición de oligosacáridos a los grupos OH de determinados residuos de serina o treonina de los polipétidos.

Algunos azúcares son adicionados de la cadena. La *O*-glicosilación es la adición de oligosacáridos a los grupos OH de determinados residuos de serina o treonina de los polipétidos. Este proceso es mediado por una serie de enzimas glicosiltransferasas (*N*-acetilgalactosaminiltransferasas) que utilizan nucleótidos de azúcares en el lumen del AG para adicionar uno a uno residuos de azúcares a una proteína. La *N*-acetilgalactosamina es adicionada primero, seguida por un número variable de residuos de azúcar que van desde unos cuantos hasta 10 o más. La *O*-glicosilación realizada en el AG es a tal grado secuencial en la adición de azúcares, que en algunos trabajos la

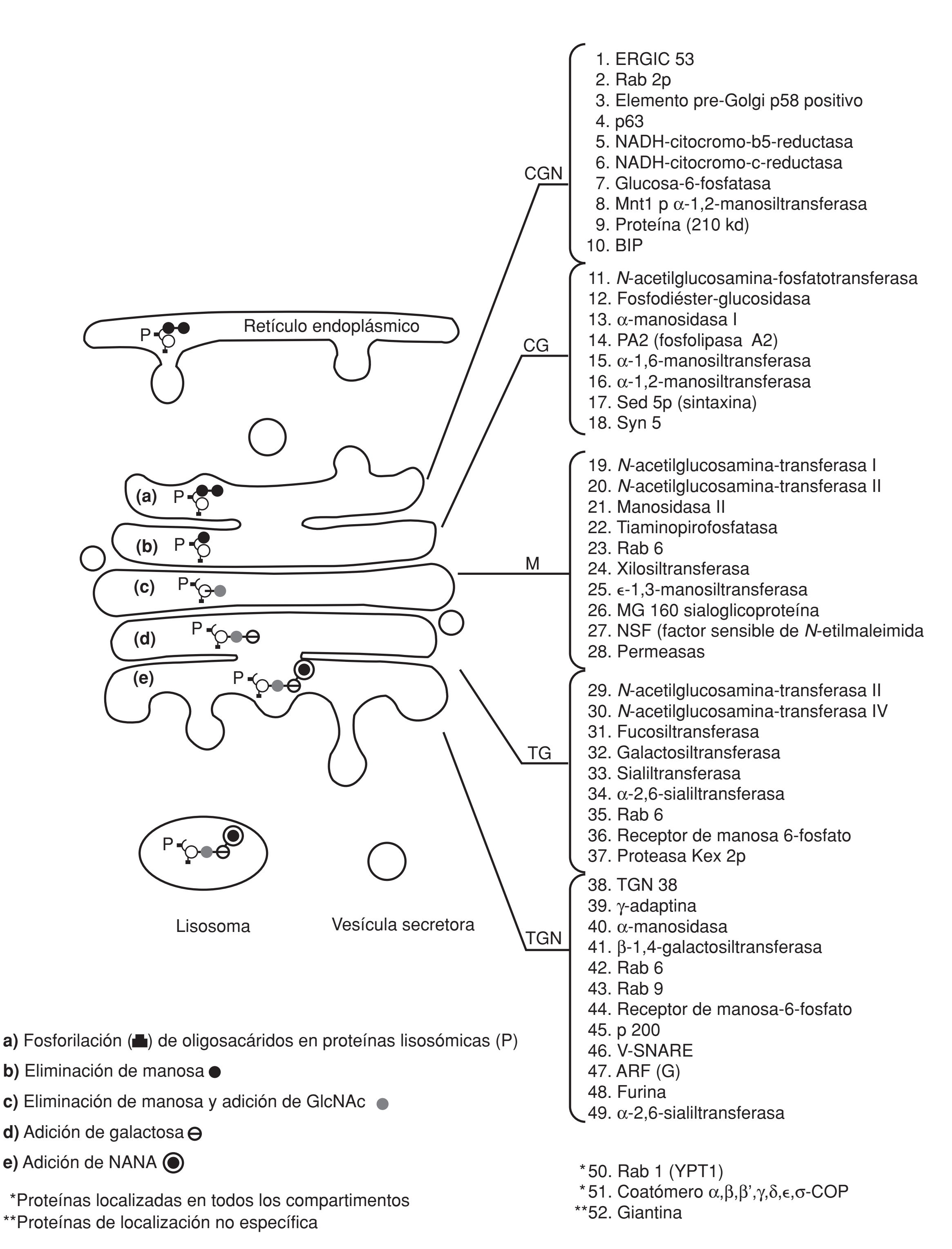


Figura 15-6. Mapa molecular del aparato de Golgi.

utilizan para hacer seguimiento de proteínas desde el retículo endoplásmico hasta el AG y existen algunas evidencias que señalan a los azúcares con unión tipo *O* en fenómenos de interacción célula-célula. Una consecuencia aparentemente universal de la *O*-glicosilación es la resistencia relativa a proteasas de las regiones *O*-glicosiladas de las glicoproteínas, como es el caso de las mucinas. Parece ser que este tipo de glicosilación también altera el tamaño y la forma de las glicoproteínas.

Fisiológicamente, la *N*-acetilglucosamina con unión *O* (*O*-GlcNAc) es altamente dinámica, abundante en todos los eucariontes y parece estar más relacionada con la fosforilación que con otros tipos de glicosilación a proteínas. La proporción de proteínas con *O*-GlcNAc incluye proteínas de poro nuclear, proteínas de cromatina, RNA-polimerasa II y sus factores de transcripción, proteínas nucleares de oncogenes, una tirosín-fosfatasa nuclear e importantes proteínas de citoesqueleto, como las citoqueratinas y la talina entre otras.

Sulfatación

La sulfatación es una modificación postraduccional de los residuos de tirosinas en proteínas.

La sulfatación es una modificación postraduccional de los residuos de tirosinas en proteínas de organismos multicelulares y en glucosaminoglicanos de células procariontes. Todas las proteínas sulfatadas que se conocen son proteínas de membrana o de secreción.

La transferencia de un grupo sulfato depende de un donador (3'-fosfoadenosín-5'-fosfosulfato o PAPS) que es transportado desde el citosol a la luz de la TGN. La reacción es catalizada por la enzima tirosilproteinsulfotransferasa (TPST). Esta enzima se encuentra retenida en el AG; sin embargo, no se conoce el mecanismo de retención.

En la biosíntesis de los glucosaminoglicanos ocurren los siguientes procesos: polimerización de los residuos de *N*-acetilglicosamina alternados con ácido glucorónico; posteriormente ocurre la *N*-desacetilación y *N*-sulfatación de la *N*-acetilglucosamina. Estos dos pasos preceden a la epimerización del ácido glucurónico a ácido L-idurónico, seguido por *O*-sulfatación tanto del ácido L-idurónico como de la glucosamina-*N*-sulfatada. Se ha mostrado ***in vitro*** que la *N*-desacetilación y la *N*-sulfatación del heparán sulfato son catalizadas por la misma enzima.

La sulfatación de los glucosaminoglicanos desempeña un papel crítico en varios procesos como la regulación de la actividad del factor de crecimiento de fibroblastos, endocitosis de lipoproteínas, adhesión y reconocimiento celular, desarrollo neuronal, infección y unión a virus. Sin embargo, para la mayoría de las proteínas sulfatadas, la importancia de este proceso no se conoce, aunque se sabe que en ocasiones es indispensable para la función de éstas. Se sugiere que la sulfatación de las tirosinas tiene alguna relevancia en el transporte intracelular de ciertas proteínas de secreción. Sólo se ha detectado sulfatación de proteínas en organismos multicelulares, pero en ningún procarionte o eucarionte unicelular.

Otros mecanismos de modificación postraduccional

Otros mecanismos de modificación postraduccional implican la adición de grupos prenil, farnesil, geranil, palmitoíl y ácido mirístico a las proteínas provenientes de la ruta RE-AG.

Otros mecanismos de modificación postraduccional implican la adición de grupos prenil, farnesil, geranil, palmitoíl y ácido mirístico a las proteínas.

La prenilación es utilizada para unir proteínas a la cara interna de la membrana plasmática. Se han identificado dos tipos de grupo prenil: el farnesil, que es un isoprenoide de 15 carbonos, y el geranil, que es una cadena de 20 carbonos. Estos grupos son adicionados a residuos de cisteína por una unión de tipo tioéster; la cisteína está localizada en la cuarta posición desde el carboxilo-terminal, formando parte de la secuencia CAAX, donde A representa un aminoácido alifático y X es metionina o serina para la farnesilación y leucina para la geranilación. No se sabe cómo se da la especificidad para el reconocimiento de destino hacia una u otra membrana.

Se utilizan dos ácidos grasos para anclar proteínas a la cara citosólica de la membrana plasmática. El ácido palmítico es una cadena saturada de 16 carbonos, la cual es unida a través de una unión sulfuro a un residuo de cisteína que está localizado cerca del carboxilo-terminal y en ocasiones al amino-terminal.

El ácido mirístico es una cadena saturada de 14 carbonos unida al grupo amino de la glicina *N*-terminal. Las proteínas miristiladas están frecuentemente asociadas a la membrana plasmática.

Un ejemplo de la importancia fisiológica de estos procesos de modificación postraduccional es la activación del producto del oncogén viral Src. La proteína oncogénica Src es una tirosin-cinasa de localización submembranal, que requiere de la miristilación para su actividad oncogénica. Proteínas oncogénicas Src mutantes, que tienen bajo nivel de miristilación, se correlacionan con baja actividad oncogénica.



Biología molecular y enfermedades asociadas al aparato de Golgi en el humano

Desde el descubrimiento del papel que desempeña el DNA en la información genética de eucariontes y procariontes, se ha generado un vertiginoso avance en el entendimiento de los mecanismos involucrados en la génesis, el mantenimiento finito de estructuras macromoleculares y el metabolismo mediante el cual dependen todos los organismos.

Los avances en la tecnología del DNA recombinante han permitido dilucidar varios aspectos en la organización, regulación y localización de múltiples genes, así como a los productos que codifican, desde elementos transponibles hasta los complejos genomas pertenecientes a mamíferos como el ser humano. Uno de los campos beneficiados de la biología celular es la morfofisiología del AG (figura 15-7). La mayoría de los avances generados hasta el momento se basa en experimentos *in vitro* realizados en células con una ruta secretoria bien desarrollada y de fácil manipulación (levaduras, oocitos de batracios, líneas celulares normales o con algún defecto en la ruta secretoria). Asimismo, como una consecuencia más del avance del

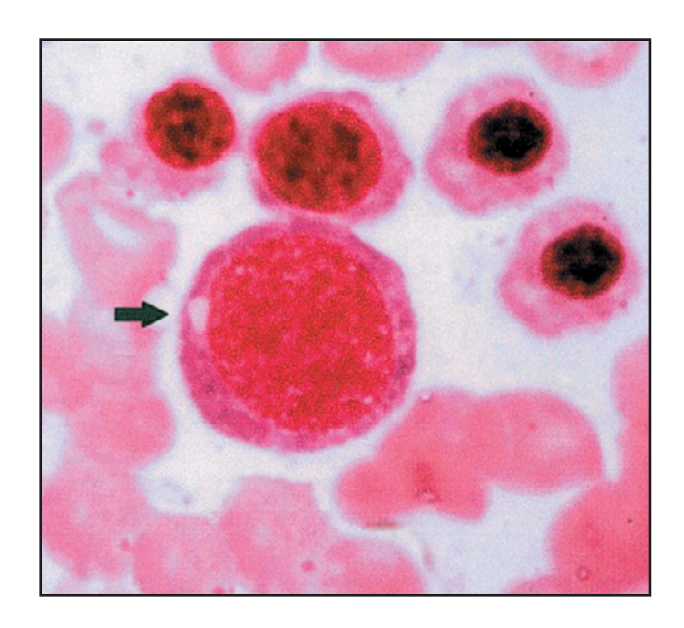


Figura 15-7. Impronta de médula ósea teñida mediante la técnica de Wright. Se pueden apreciar algunas de las células pertenecientes a las diferentes etapas de la maduración de la serie eritroide. Al centro, un proeritroblasto muestra la típica imagen negativa de Golgi (flecha). Este tipo celular experimentará múltiples divisiones celulares para formar un eritrocito maduro, por lo que es necesario la síntesis de grandes cantidades de membrana celular, la cual se lleva a cabo gracias a una de las diversas funciones que tiene uno de los organelos más importantes de la vía exocítica: el aparato de Golgi. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

proyecto científico más importante del siglo, el proyecto genoma humano, se ha podido caracterizar a genes que codifican proteínas residentes del AG y cuyas alteraciones se asocian a padecimientos bien definidos.

El empleo de genotecas, incluyendo bibliotecas de cDNA, así como el mapeo por medio de análisis de ligamiento, han conducido a la identificación de algunos miembros que conforman las familias de genes de las proteínas COP, Rab/Sec y enzimas involucradas en los procesos de modificación postraduccional. En levaduras específicamente, se han realizado estudios bioquímicos y genéticos de complementación y transfección que han permitido identificar al menos 20 versiones de genes mutados sensibles a temperatura. La complementación consiste en realizar una fusión de una levadura, generalmente sensible a la temperatura y deficiente en alguna de las etapas de la ruta secretoria, con otra que no lo sea. Esta estrategia permite el aislamiento del gen tipo silvestre en las cepas deficientes, ya que el producto silvestre tiende a la sobreexpresión. El siguiente paso es crear librerías genómicas o de cDNA de estas cepas de complementación y posteriormente la identificación del gen responsable y la clonación de éste para estudios posteriores (por ejemplo, transfección y otras señaladas en la tabla 15-2).

Tabla 15-2. Estrategias de biología molecular aplicables al estudio del AG.

Transfección con proteínas quiméricas
Ratones transgénicos
Aislamiento de mutantes (líneas celulares), complementación
Ensayos en sistemas acelulares de retículo endoplásmico-aparato de Golgi
Bibliotecas genómicas
Bibliotecas de cDNA y análisis predictivo de secuencias
Mutagénesis dirigida
Genes knock-out

Las levaduras como un modelo para el estudio del aparato de Golgi

Los modelos experimentales en levaduras que utilizan cepas sensibles a temperatura, permiten una identificación morfológica objetiva de los defectos existentes a nivel de la ruta secretora y a la vez los efectos restaurativos de la complementación. El defecto en levaduras se aprecia como la acumulación en el AG de núcleos glicosilados de proteínas típicas de exportación (por ejemplo, factor pro-α-invertasa) o de las proteínas vacuolares (por ejemplo, carboxipeptidasa Y).

Muchas de las cepas de levaduras mutantes en alguno de los genes pertenecientes a la familia *Sec,* pueden ser clasificadas en dos clases: aquellas que portan defectos en la formación de vesículas (clase I: genes mutantes *Sec*12, *Sec*13, *Sec*16 y *Sec*23) y aquellas que forman vesículas con diámetros de aproximadamente 50 nm, pero que no secretan y sufren acumulación en el citosol a temperaturas no permisivas (clase II: genes mutantes *Sec*17, *Sec*18 y *Sec*22). Esta última clase parece deberse a una señalización defectuosa en el transporte anterógrado RE-AG.

La información para realizar la clasificación de levaduras mutantes en dos grupos se generó con base en cuatro estrategias:

Análisis predictivo de secuencias clonadas

Destacan las proteínas Ypt1 y Sec4p, cuyo análisis predictivo de secuencia demostró dominios típicos de unión a GTP y residuos C-terminales de cisteínas susceptibles de prenilación, tales como los que se presentan en las proteínas pertenecientes a la familia de genes Rab y Ras en mamíferos. Estos datos apoyaron la hipótesis de que tanto Ypt1p y Sec4p podrían ser proteínas ancladas a la membrana (mediante prenilación) y que participasen en señalización y tráfico vesicular. Con estudios inmunológicos y de complementación, utilizando inclusive la proteína homóloga de mamífero, se logró confirmar el papel de estas dos proteínas en el tráfico vesicular. Así, Ypt1p y Sec4p fueron las primeras proteínas de bajo peso molecular cuyo papel fisiológico se demostró mediante la estrategia del análisis predictivo de secuencias.

Comportamiento de extractos celulares obtenidos a partir de mutantes o carentes de productos específicos en ensayos in vitro *(sistemas reconstituidos RE-AG acelulares)*

La adición de proteínas a líneas celulares deficientes en alguna de las etapas de la vía secretora son ensayos que permiten indagar la función de una proteína en particular. Por ejemplo, se sabe que los genes que codifican para el factor de sensibilidad a *N*-metilmaleimida o NSF (en mamíferos) y de

Sec18p (levadura) tienen grandes similitudes en cuanto a secuencias, lo cual habla de su conservación a lo largo de la filogenia, pudiendo asimismo esperar funciones similares para ambas proteínas aun cuando provengan de especies muy distanciadas evolutivamente. Sec18p contribuyó al conocimiento de la función del NSF en mamíferos, mediante experimentos consistentes en la adición de Sec18p silvestre a células de mamífero tratadas con *N*-metilmaleimida; Sec18p demostró revertir el efecto inhibitorio de la droga sobre el tráfico vesicular. Asimismo versiones mutadas de Sec18p no pudieron restablecer la función normal.

Inhibición por anticuerpos

Se han diseñado múltiples anticuerpos monoclonales específicos que reconocen a uno o más epítopos de proteínas residentes de AG, incluyendo en levadura a la familia de genes *Sec*. La gran similitud entre las proteínas codificadas por la familia de los genes *Sec* y sus contrapartes en mamíferos, ha permitido que anticuerpos que reconocen sitios antigénicos en levadura reconozcan también el sitio homólogo en la versión de mamífero, como es el caso de un anticuerpo monoclonal, que reconoce a Sec23p de levadura y es capaz de precipitar a su homólogo en células exocrinas y endocrinas del páncreas. Esta proteína reside en la región *cis*-Golgi y, al igual que Sec23p, participa en el transporte vesicular anterógrado RE-AG.

Identificación y caracterización de los polipéptidos codificados por genes supresores

El fenómeno conocido como "letalidad sintética" consiste en crear, mediante fusión celular, dobles mutantes de levaduras que presenten defectos a distinto nivel, pero dentro del mismo proceso de secreción. Generalmente, las dobles mutantes resultantes requieren una temperatura aun menor a la previamente requerida para su crecimiento; si esto ocurre, al fenómeno se le denomina letalidad sintética y se traduce como una posibilidad para identificar una proteína candidata a ser estudiada por biología molecular, la cual participe en la ruta secretora. Los genes mutados en cada cepa se consideran genes supresores y muchos de los productos codificados por estos genes son proteínas que interactúan topológica y funcionalmente entre ellas; tal es el caso de la combinación letal de mutantes en los *loci Sec*12/*Sec*17.

Biología molecular del aparato de Golgi en mamíferos

Actualmente, se conoce el cDNA y la localización de los genes en el mapa físico de muchas de las enzimas residentes del AG involucradas en las modificaciones postraduccionales de proteínas que intervienen en la ruta

Tabla 15-3. Enzimas modificadoras residentes del AG.

cDNA	*Locus* en humano	Enfermedad relacionada
β-1,4-galactosiltransferasa	?	Ninguna documentada
N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa	4q21-q23	Mucolipidosis II y III (?)
α-2,6-sialiltransferasa	?	Deficiencia de glicoproteínas (?)
α-manosidasa II	Cromosoma 5	Ninguna documentada
α-3- y α-1-fucosiltransferasa	19q13.1-q13.11	Ninguna documentada
α-4-fucosiltransferasa	11q21	Ninguna documentada

secretora. Asimismo, la caracterización del gen y su producto ha contribuido al entendimiento de la fisiopatología de algunas enfermedades en el humano, ya que incluso se han descrito mutaciones en genes que codifican enzimas modificadoras de AG o proteínas involucradas en el transporte vesicular. En la tabla 15-3 se señalan algunos ejemplos; cabe aclarar que de todas ellas se cuenta con el cDNA.

En la mucolipidosis y la deficiencia de glicoproteínas, aún no se tiene el gen responsable y muy probablemente, en la segunda, se trate de una enfermedad *multilocus*, aunque las reacciones metabólicas propias de estas enzimas no se están llevando a cabo. A continuación explicaremos brevemente las características de estos dos padecimientos cuyos defectos evidentemente están relacionados con el procesamiento postraduccional de proteínas que pasan a través de la ruta secretora.

Mucolipidosis II y III

La mucolipidosis II o *I-cell disease* (por la presencia de múltiples inclusiones en el citoplasma de los fibroblastos en cultivo de estos pacientes) y la tipo III, o polidistrofia pseudo-Hurler, son entidades monogénicas y con un modo de herencia autosómico recesivo.

La tipo II se parece clínica y radiológicamente a la enfermedad de Hurler (padecimiento con trastornos en la degradación lisosómica de mucopolisacáridos), pero, a diferencia de ésta, la *I-cell disease* se presenta a muy temprana edad y no tiene mucopolisacariduria. El curso de la enfermedad se caracteriza por importante retraso mental progresivo y serias malformaciones esqueléticas; desafortunadamente, los pacientes mueren durante la primera década de vida, pues no existe tratamiento curativo para esta enfermedad. La variante pseudo-Hurler tiene una progresión más lenta en cuanto al deterioro neurológico y, aunque presentan anomalías cardiovasculares (valvulopatías y regurgitación aórtica), los pacientes tienden a sobrevivir hasta la edad adulta.

En ambas enfermedades se sabe que existe una señalización anómala de enzimas lisosomales en las células de tejidos mesenquimatosos. Como es bien sabido, las hidrolasas lisosomales, durante su paso por *cis*-Golgi, adquieren, mediante una modificación postraduccional, residuos de manosa-6-fosfato, únicos en estas glicoproteínas, siendo estos residuos la señal

Las hidrolasas lisosomales, durante su paso por *cis*-Golgi, adquieren residuos de manosa-6-fosfato.

esencial para que las hidrolasas se destinen hacia los compartimentos lisosomales. La incapacidad de las células para llevar a cabo este proceso de manera normal, conlleva a que los pacientes tengan cantidades anormalmente elevadas en sangre y, en general, en el espacio extracelular de hidrolasas lisosómicas. La adición de los residuos de manosa-6-fosfato se dan básicamente en dos etapas facilitadas por dos enzimas en el AG: la UDP-*N*-acetilglucosamina-transferasa y la *N*-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (fosfotransferasa 1). La fosfotransferasa 1 es una enzima anclada a la membrana de las cisternas del AG y presenta tres dominios característicos: transmembranal, catalítico y de reconocimiento. Gracias al dominio de reconocimiento, la enzima tiene una afinidad 100 veces mayor por las hidrolasas lisosómicas que por el resto de las glicoproteínas que atraviesan el AG. Esta especificidad no parece estar determinada por los carbohidratos presentes en la hidrolasa, pero sí por la conformación tridimensional que adopta el polipéptido en el dominio C-terminal (aa 188 a 203, especialmente la Lys 203 y de los aa 265 a 292). Intentos por encontrar mutaciones en los genes que codifican a estas enzimas o la verificación del estado funcional de éstas mediante estudios bioquímicos no han encontrado deficiencias cualitativas y cuantitativas en ninguna de ellas, lo cual supone la presencia del defecto en etapas previas o ulteriores al proceso. Actualmente se están verificando hipótesis que giran en torno al papel del pH *intra*-Golgi necesario para inducir una conformación tridimensional en las hidrolasas, misma que es necesaria para que la fosfotransferasa I pueda reconocerlas como sustrato. El *locus* de la fosfotransferasa I se ha mapeado en 4q21-q23 (mediante análisis de ligamiento, análisis de segregación de híbridos o complementación, microdeleciones) y se sabe que se encuentra flanqueado teloméricamente por el gen de la enfermedad poliquística del adulto tipo II y un candidato a oncogén.

Deficiencia de glicoproteínas

Se han descrito pocos individuos afectados por esta enfermedad. El padecimiento aparentemente se presenta como un carácter recesivo, probablemente *multilocus*. Característicamente, estos pacientes presentan alteraciones en las glicoproteínas séricas (glicoproteínas de exportación), que consisten en un peso molecular menor al esperado y esto debido a un bajo nivel de glicosilación. Suelen catalogarse inicialmente como pacientes con hemofilia u otros trastornos hemorrágicos, ya que los factores de la coagulación XI y la antitrombina III presentan anormalidades en su activación, lo que conduce a presentar un riesgo elevado de hemorragia intracraneana. Fenotípicamente presentan dismorfias, retraso psicomotor, alteraciones dermatológicas, oftalmológicas y de la función hepática. Las glicoproteínas alteradas son las siguientes: proteína de unión a tiroxina o TBG (que conduce a un transporte deficiente de la hormona), haptoglobina, transcortina, apolipoproteína b, α1-antiquimiotripsina y α1-antitripsina, los factores de complemento C3a y C4a y la transferrina. Esta última glicoproteína sérica se ha usado como el estándar diagnóstico de laboratorio para identificar el

síndrome. Todas las glicoproteínas cuentan con un contenido normal de tres manosas, pero carecen del resto de las subsiguientes ramificaciones de carbohidratos adquiridas en el mismo AG, especialmente aquellas que consisten en ácido siálico. La transferrina posee en su estructura primaria polipeptídica dos sitios de asparagina potencialmente glicosilables. En forma normal, durante su paso por el AG, más de 90% de la transferrina adquiere cuatro residuos de ácido siálico, dos por cada sitio de asparagina. A esta forma se le denomina tetrasialotransferrina, aunque de manera normal también existen formas de transferrina parcialmente glicosiladas (< 10% de la transferrina circulante), denominadas asialo/diasialotransferrina. En los afectados por el síndrome, las formas parcial o no glicosiladas de la transferrina ocupan más de 90% de la transferrina circulante, es decir, la relación tetrasialo/a-disialotransferrina se invierte, con lo cual se hace el diagnóstico. Tal como sucede con la mucolipidosis II y III, no se han encontrado defectos objetivos en la sialiltransferasa del AG y además por análisis de ligamiento en algunas familias existe la posibilidad de que se trate de una enfermedad *multilocus*. Asimismo, aún no se descarta la posibilidad de mutaciones en el gen de la sialiltransferasa.

Las enfermedades antes explicadas son defectos atribuibles a enzimas involucradas en modificaciones postraduccionales de glicoproteínas. Hoy en día se han podido caracterizar proteínas involucradas en el transporte vesicular anterógrado de la ruta secretora así como a sus respectivos genes. Esto conlleva en forma adicional a la identificación de padecimientos de origen genético en el humano, cuyo defecto básico se debe a alteraciones en este tipo de genes. A continuación se describen algunos de estos defectos.

Coroideremia

Este padecimiento se caracteriza por presentar invariablemente degeneración retiniana y de coroides, la cual está determinada genéticamente, con un modo de herencia recesivo ligado al cromosoma X, por lo que la mayoría de estos pacientes son masculinos. Usualmente, el primer signo de afectación ocular consiste en ceguera nocturna que inicia en la infancia temprana que progresivamente conduce a la ceguera total alrededor de los 20 años de edad, aunque algunos pierden la visión en forma total hasta los 45 años (figura 15.8). El campo visual periférico es el más afectado y sólo en etapas avanzadas de la enfermedad el defecto se hace central. Pueden existir mujeres afectadas por coroideremia (*CHM*) cuando existen en ellas translocaciones entre cromosoma X y autosoma o cuando se trata de inactivación preferencial del cromosoma X.

Actualmente el gen responsable (*CHM*) ha podido ser clonado y se encuentra mapeado en el *locus* Xq21, donde ocupa aproximadamente 4.5 kb (figura 15-9). Esto se logró gracias a estudios de ligamiento en familias con *CHM* y por el hallazgo de microdeleciones citogenéticamente evidenciables de Xq21 en varones afectados. El *locus CHM* transcribe un mensajero de aproximadamente 6 kb que se traduce en una proteína de 653 aa denomi-

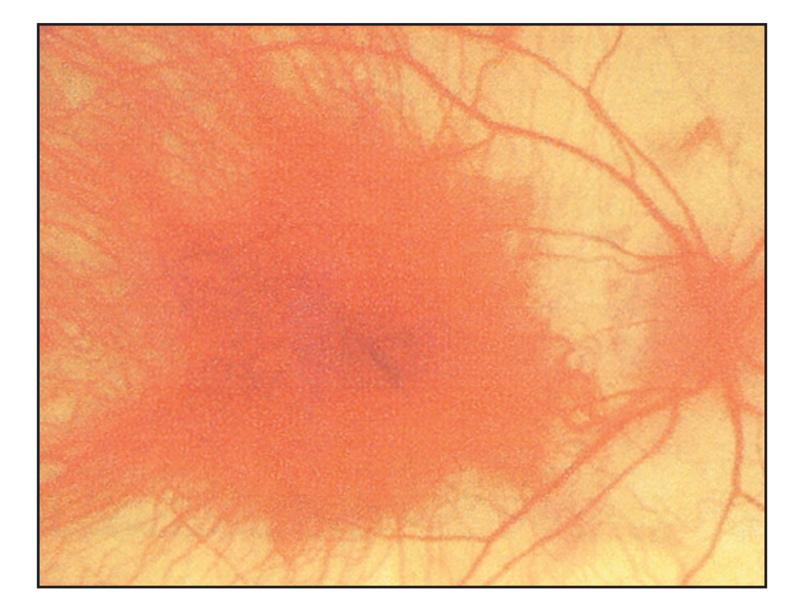


Figura 15-8. Estudio de fondo de ojo de un paciente con coroideremia avanzada. Nótese las graves alteraciones coriorretinianas en la región macular. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

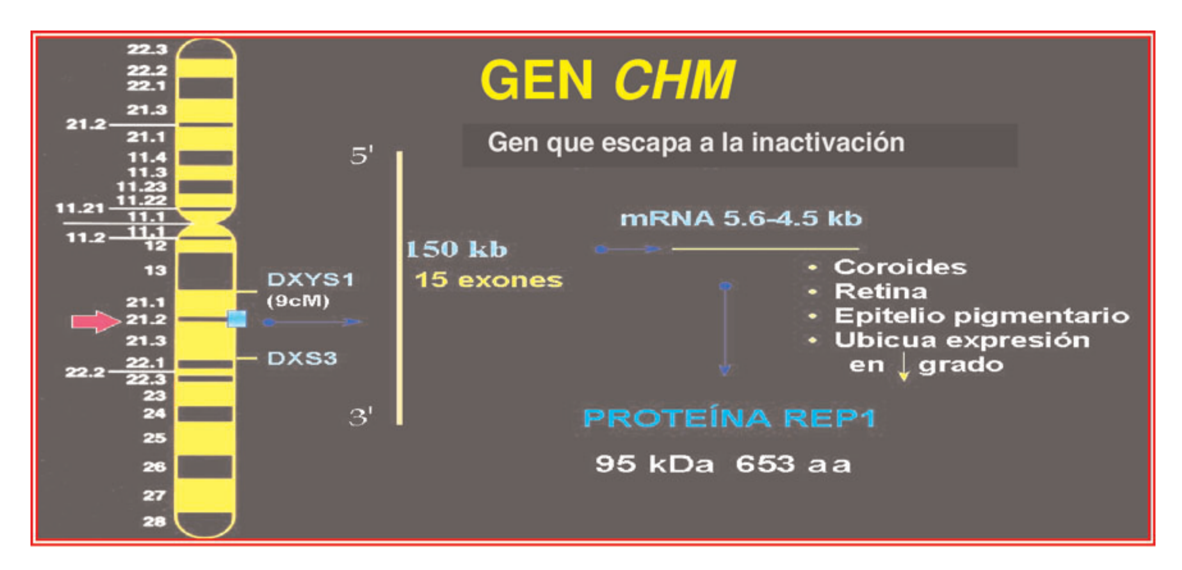


Figura 15-9. Esquema del *locus CHM* y su producto. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

nada REP (de las siglas en inglés *rab escort protein*) y con un peso de 95 kDa. Estudios por *zoo-blot* muestran que es un gen altamente conservado en la filogenia; de hecho, existe 97% de similitud entre la secuencia aminoacídica del *CHM* de ratón y *CHM* de humano, siendo en forma adicional de 88% la identidad nucleotídica y aminoacídica entre ambos genes.

REP participa en la regulación del transporte vesicular anterógrado de RE-AG y tiene una relación topológica y funcional íntima con la enzima geranil-geranil-transferasa II (GGT-II). Esta última se compone de dos subunidades (de reconocimiento y catalítica, a y b, respectivamente). La función

de la GGT-II es prenilar a algunos miembros de la familia Rab para que se lleve a cabo el transporte vesicular; así, la proteína REP funge como un regulador de la prenilación de las proteínas Rab y por consecuencia del transporte vesicular, básicamente en la zona de transición de RE-AG. En el estado inactivo de la GGT-II, sus dos subunidades se encuentran acopladas en el lado citosólico de las vesículas de transporte en la zona de transición RE-AG. La subunidad catalítica de GGT-II se activa cuando REP interactúa con la subunidad de reconocimiento y con las proteínas Rab (1a, 3a, 2, 5 y 7). Una vez activada la subunidad catalítica de GGT-II, las proteínas Rab sufren un proceso de prenilación que las vuelve activas en la superficie de la vesícula de transporte en la zona de transición (especialmente Rab1a y 3a). Una vez ocurrida la prenilación, GGT-II vuelve a su estado inactivo en forma de dímero a/b; sin embargo, REP permanece unida a Rab1a y Rab3a prenilada hasta que la vesícula alcance su destino, para después ser liberada y así comenzar de nuevo el ciclo. REP también permanece unida a proteínas de la familia Rab en su estado prenilado en vesículas de transporte (Rab5 y 7) y en vesículas sinápticas (Rab3a).

Las mutaciones en el gen *CHM* que originan el cuadro consisten básicamente en grandes rearreglos originados por errores de recombinación en la línea germinal materna, tales como deleciones intragénicas o totales, translocaciones entre cromosoma X y autosomas y mutaciones de tipo puntual. El estudio de Southern blot pone de manifiesto las deleciones en estos pacientes. En la mayoría de los pacientes, el estudio de Northern blot en tejido retiniano y de coroides muestra ausencia del transcrito. Cabe aclarar que éstos son dos de los tejidos, aparte del SNC, que muestran transcripción activa del gen *CHM*.

Durante el transcurso de la clonación de *CHM*, se logró identificar un gen autosómico homólogo (*CHML*: de las siglas en inglés *choroideremia-like syndrome*), el cual ahora se sabe que mapea en 1q42-qter. El cDNA posee un marco de lectura para una proteína de 656 aminoácidos con 76% de identidad aminoacídica con *CHM* y 95% de similitud. Existe 80% de identidad entre las secuencias nucleotídicas de los cDNA, *CHML* y *CHM*. Mutaciones generalmente de tipo puntual que ocurren en el gen *CHML* producen un síndrome de coroideremia con un modo de herencia autosómico recesivo, aunque aún no se sabe con exactitud cómo participa esta proteína en el tráfico vesicular.

Síndrome de Lowe (síndrome oculocerebrorrenal)

El síndrome de Lowe u oculocerebrorrenal es un trastorno genético que se hereda en forma recesiva ligada al cromosoma X, el cual se caracteriza por cataratas congénitas, disfunción renal tubular y déficit neurológico. El desarrollo de las cataratas comienza desde la 7a. a 9a. semana de gestación, debido a anomalías en la migración del epitelio del cristalino. Durante el periodo neonatal inmediato los pacientes presentan proteinuria, aminoaciduria, fosfaturia y acidosis metabólica, así como retardo mental, hipotonía, trastornos de la conducta y ausencia de reflejos osteotendinosos profundos.

El gen responsable de esta enfermedad (*OCRL-1*) se ha mapeado gracias a análisis de ligamiento, síndrome por microdeleción cromosómica y translocaciones autosoma:cromosoma X. Esta última anomalía citogenética permitió su clonación. La secuencia codificante completa se obtuvo a partir de bibliotecas de cDNA de plaquetas y tejido placentario humanos. El gen transcribe un mRNA de 5.7 kb que se traduce en una proteína con actividad enzimática de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato-5-fosfatasa, cuyo peso molecular es de 105 kDa, misma que guarda grandes similitudes con la inositol-polifosfato-5-fosfatasa de 75 kDa, cuyo gen mapea en 1p y el cual presenta 53% de identidad aminoacídica y 71% de similitud estructural con el gen *OCRL-1*. El equivalente en levaduras parece ser Sec14p. El transcrito del gen ha podido ser detectado en prácticamente todos los tejidos, especialmente en cerebro, riñón, músculo estriado, placenta, pulmón, ovario, testículo y fibroblastos, con excepciones importantes como son leucocitos, timo y bazo, ovario, testículo y fibroblastos.

Los pacientes afectados por la enfermedad característicamente muestran ausencia de la actividad enzimática en sus fibroblastos en cultivo, así como una falta total de señal en la inmunolocalización de la proteína en la región de AG.

Estos dos hallazgos de laboratorio confirman el diagnóstico clínico del síndrome. Las mutaciones descritas para este síndrome van desde grandes rearreglos (translocaciones autosoma:cromosoma X, microdeleciones cromosómicas), mutaciones de tipo puntual o microinserciones/deleciones e incluso ausencia total del transcrito.

El producto de *OCRL-1* colocaliza con otras proteínas típicas de AG, tales como β-COP en fibroblastos humanos normales, siendo una proteína residente del AG. Se sabe que su sustrato, el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, participa como un metabolito mediador de la ADP-ribosilación, la fosfolipasa D y en el ensamblaje de la actina del citoesqueleto. El primer proceso está fuertemente involucrado en el transporte vesicular *intra*-Golgi y el mantenimiento de la organización del organelo. Asimismo, se ha especulado que el índice de fosfatidilinositol:fosfatidilcolina en las membranas de AG, y sus vesículas derivadas, tiene que ver con la fusión de éstas con las membranas aceptoras (membrana celular, endosomas, etc.). La contraparte enzimática de la enzima codificada por *OCRL-1* es la fosfatidilinositol-4-fosfato-5-cinasa, la cual se encuentra en las vesículas derivadas de AG.

La hipótesis sugerida para explicar los efectos drásticos producidos por la ausencia de la enzima, se basa en la existencia de alteraciones en el metabolismo del fosfatidilinositol en membranas de vesículas y del AG, las cuales ocasionan disrupción del tráfico vesicular. El bajo nivel de tráfico vesicular ocasionado por la deficiencia de la enzima podría causar que la intensa renovación necesaria de membranas en tejidos especializados, por ejemplo, riñón y cerebro, tuvieran una membrana celular alterada debido a la poca renovación brindada por el AG. Hasta el momento no se han observado inclusiones citosólicas evidentes de algún producto que atraviese la vía exocítica. Pese a todo, no se sabe con certeza la causa de las alteraciones tan

importantes que ocasiona la ausencia de esta enzima residente de AG, especialmente a nivel cerebral, renal y ocular.

Enfermedad de Menkes

Los defectos en el transporte de cobre reconocidos en el humano hasta el momento son tres y la enfermedad de Menkes es una de ellas. Ésta se caracteriza por presentar importantes defectos en el transporte intracelular del cobre que se traducen como una deficiencia intracelular del metal como cofactor de varias enzimas involucradas en el metabolismo de tejido nervioso y conectivo, tales como la lisil-oxidasa que favorece el entrecruzamiento entre colágena y elastina, superóxido-dismutasa que elimina radicales superóxido, citocromo-oxidasa en metabolismo energético, tirosinasa que participa en la formación de melanina, y la dopamín-β-hidroxilasa que actúa en el metabolismo de este neurotransmisor. La enfermedad generalmente ocasiona la muerte del individuo en la primera década de vida (alrededor de los 2 años) y se hereda en forma recesiva al cromosoma X.

Clínicamente, los afectados se caracterizan por presentar niveles prácticamente ausentes en la absorción intestinal de cobre con acumulación del metal en las células del epitelio intestinal o en fibroblastos en cultivo, cabello depigmentado y ensortijado, facies característica, hipotermia, piel laxa y degeneración de la capa media de vasos arteriales debido a una síntesis deficiente de elastina, degeneración cerebelosa, osteoporosis de aparición temprana, entre otros hallazgos clínicos. No existe tratamiento curativo hasta el momento; sin embargo, la administración de histidinato de cobre parece alargar el periodo de supervivencia.

El gen responsable de la enfermedad de Menkes (*MNK* o *ATP7A*) se ha mapeado en el *locus* Xq13, donde ocupa más de 100 kb; está organizado en 23 exones y se transcribe en un mensajero de 8.5 kb. Al igual que los genes descritos anteriormente, se pudo clonar gracias a la identificación de una mujer con translocación del cromosoma X (en Xq13): autosoma. La región 5' no traducible junto con el exón 1 (el cual no se traduce completamente) se encuentran separados del exón 2 por un intrón de más de 40 kb. Actualmente se han clonado y se han encontrado sus contrapartes en levadura (*CCC2*), hámster (con el que existe 90% de identidad e inmunorreactividad cruzada) y en ratón. En bacterias se han encontrado miembros cercanos. El producto de este gen se expresa prácticamente en todos los tejidos, pero de forma interesante se encuentra ausente en el hígado. Se ha sugerido que la proteína deficiente en el síndrome de Menkes funciona como un sensor del cobre intracelular, pues, cuando a fibroblastos se les somete a altas concentraciones del metal, la ATP7A rápidamente se relocaliza de la región *trans*-Golgi hacia la membrana celular, suponiendo una expulsión del exceso de cobre intracelular y a la inversa cuando el cobre disminuye.

Mediante genética reversa y utilizando análisis predictivo de secuencias de cDNA, también se pone de manifiesto la presencia de seis dominios posibles de unión a metales y un dominio CPC (cisteína-prolina-cisteína) inmerso en uno de los ocho dominios transmembranales de la proteína y el

cual funge como canal en el mecanismo de translocación del metal desde el espacio extracelular hacia el interior de una vesícula de transporte endocítico; este mecanismo propuesto recuerda al transporte de hierro. La estructura de la proteína transmembranal (ATP7A) codificada por el gen *MNK* corresponde a un típico miembro de la familia de las ATPasas transportadoras de cobre reguladas por fosforilación, ya que posee dominios Thr-Gly-Glu que fungen como transductores de la energía liberada por la hidrólisis del ATP para el transporte de cobre; secuencias Cys-Pro-Cys que forman un canal para cationes; residuos fosforilables de aspartato altamente conservados que participan como intermediarios fosforilados durante el ciclo de transporte del cobre y finalmente un dominio C-terminal que funge como sitio de unión a ATP. El diseño de anticuerpos monoclonales contra péptidos sintéticos ha podido evidenciar que el producto de *MNK* colocaliza con α-manosidasa II, una enzima típica residente del AG. Estudios inmunocitoquímicos en líneas celulares tratadas con brefeldina A han podido delimitar la localización subcelular precisa de esta proteína, demostrando que es una proteína de localización en la red *trans*-Golgi.



Referencias bibliográficas

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J.D., *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL*, 4a. edición, Garland Publishing, Nueva York, 1994.

Alcalde, J.; Bonay, P.; Roa, A.; Vilaro, S. y Sandoval, V., "Assembly and disassembly of the Golgi complex: Two processes arranged in a cis-trans direction", *J. Cell Biol.,* **116(1):** 69-83, 1992.

Alcántara, O. y cols., "Biología celular y molecular del aparato de Golgi", 1a. edición, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F., 1994.

Andres, D.A.; Seabra, M.C.; Brown, M.S.; Armstrong, S.A.; Smeland, T.E.; Cremers, F.P.M. y Goldstein, J.L., "cDNA cloning of the component A of Rab geranylgeranyl transferase and demostration of its role as a Rab escort protein", *Cell,* **259:** 377-384, 1993.

Attree, O.; Olivos, M.I.; Okabe, I.; Bailey, L.C.; Nelson, D.L.; Lewis, R.A.; McInnes, R.R. y Nussbaum, R.L., "The Lowe oculocerebrorenal syndrome gene encodes a novel protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase", *Nature,* **358:** 239-242, 1992.

Bannyhk, S.I. y Bakch, W.E., "Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum Golgi interface", *J. Cell Biol.,* **138:** 1-4, 1997.

Barlowe, C.; Orci, L.; Yeung, T.; Hosobuchi, M.; Hamamoto, S.; Salama, N.; Rexach, M.F.; Ravazzola, M.; Amherdt, M. y Schekman, R., "COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicles budding from the endoplasmic reticulum", *Cell,* **77(6):** 895-907, 1994.

Beckers, J.M. y Rothman, J.E., "Transport between Golgi cisternae", *Meth Enzymol.,* **219:** 5-12, 1992.

Bonay, P. y cols., "Intra-Golgi transport inhibition by megalomicin", *J. Biol. Chem.,* **271(7):** 3719-3726, 1996.

Bos, C.R. y cols., "Role of clathrin-coated vesicles in glycoprotein transport from the cell surface to the Golgi complex", *J. Biol. Chem.,* **270(2):** 665-671, 1995.

Brown, H.A.S.; Gutowski, S.; Moomaw, C.R.; Slaughter, C. y Sternweis, P.C., "ADP-ribosylation Factor, a Small GTP-dependent Regulatory Protein, Stimulates Phospholipase Activity", *Cell,* **75:** 1137, 1993.

Cockcrofts, S. y cols., "Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes", *Science.,* **263:** 523-526, 1994.

Cosson, P. y Letourneur, F., "Coatomer interaction with Di-Lysine Endoplasmic reticulum retention motifs", *Science.,* **263(5153):** 1629-1631, 1994.

Cox, D.W., "Genes of the copper pathway", *Am. J. Hum. Genet.,* **56:** 828-834, 1995.

Cremers, F.P.M.; Armstrong, S.A.; Seabra, M.C.; Brown, M.S. y Goldstein, J.L., "REP-2, a Rab escort protein encoded by the choroideremia-like gene", *J. Biol. Chem.,* **269:** 2111-2116, 1994.

———— ; Molloy, C.M.; Van den Pol, T.J.R.; Van den Hurk, J.A.J.M.; Bach, I.; Geurts van Kessel, A.H.M. y Ropers, H.H., "An autosomal homologue of the CHM gene colocalizes with the Usher syndrome type II locus on the distal part of chromosome 1q", *Hum. Mol. Genet.,* **1:** 71-79, 1992.

Descoteaux, A.; Luo, Y.; Turco, J. y Beverley, S.M., "A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania", Science,* **269:** 1869-1872, 1995.

Díaz, J.A.M.; Monteiro-Leal, L.H. y De Souza, W., "*Tritrichomonas foetus*: Isolation and characterization of the Golgi complex", *Exp. Parasitol.,* **83:** 174-183, 1996.

———— y De Souza, W., "Biochemical characterization of the Golgi-complex proteins of *Tritrichomonas foetus*", *Parasitol. Res.,* **84:** 760-762, 1998.

Dierick, H.A.; Adam, A.N.; Escara, J.F. y Glover, T.W., "Immunocytochemical localization of the Menkes copper transport protein (ATP7A) to the *trans*-Golgi network", *Hum. Mol. Genet.,* **6:** 409-416, 1997.

———— ; Ambrosini, L.; Spencer, J.; Glover, T. y Mercer, J.F.B., "Molecular structure of the Menkes disease gene (*ATP7A*)", *Genomics,* 462-469, 1995.

Duden, R.; Griffiths, G.; Frank, R.; Argos, P. y Kreis, T.E., "COP, a 110 kDa Protein Associated with non-clathrin-coated Vesicles and the Golgi Complex, Shows Homology to –adaptin", *Cell,* **64:** 649-665, febrero de 1991.

Duszenko, M.; Ivanov, I.E.; Ferguson, M.A.J.; Plesken, H. y Cross, G.A.M., "Intracellular transport of a variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*", *J. Cell Biol.,* **106:** 77-86, 1988.

Ghosh, S.K.; Field, J.; Frisardi, M.; Rosenthal, B.; Mai, Z.; Rogers, R. y Samuelson, J., "Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica trophozoites*: Localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi Apparatus", *Infect. Immun.,* **67(6):** 3073-3081, 1999.

Guo, Q.; Vasile, E. y Krieger, M.J., "Disruptions in Golgi structure and membrane traffic in a conditional lethal mammalian cell mutant are corrected by epsilon-COP", *Cell Biol.,* **125(6):** 1213-1224, 1994.

Gupta, R.S.; Aitken, K.; Falah, M. y Singh B., "Cloning of the *Giardia lamblia* heat shock protein HSP70 homologs: implications regarding origin of eucaryotic cells and of endoplasmic reticulum", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **91:** 2895-2899, 1994.

Hart, G.W., "Glycosilation", *Curr. Op. Cell Biol.,* **4:** 1017-1023, 1992.

Hartmann, E.; Sommer, T.; Prehn, S.; Gorlich, D.; Jentsch, S. y Rapoport, T.A., "Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex", *Nature,* **367(6464):** 654-657, 1994.

Hicke, L. y Schekman, R., "Yeast Sec23p acts in the cytoplasm to promote protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex *in vivo* and *in vitro", Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **8(6):** 1677-1684, 1989.

Honigberg, B.M.; Mattern, C.F.T. y Daniel, W.A., "Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller)", *J. Protozool.,* **18:** 183-192, 1971.

Jackson, M.R.; Nilsson, T. y Peterson, P.A., "Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum", *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **9:** 3153-3162, 1990.

Jentoft, N., "Why are proteins *O*-glycosylated?", *TIBS,* 291-294, 15 de agosto de 1990.

Kaiser, C.A. y Schekman, R., "Distinct sets of Sec genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway", *Cell,* **61(4):** 723-733, 1990.

Ktistakis, N.T. y cols., "Action of brefeldin A blocked by activation of a pertussis-toxin sensitive G protein", *Nature,* **356:** 344-346, 1992.

Lanfredi-Rangel, A.; Kattenbach, W.M.; Diniz, J.A. y De Souza, W., "Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure", *FEMS Microbiol. Letters,* **181:** 245-251, 1999.

Leipe, D.D.; Gunderson, J.H.; Nerad, T.A. y Sogin, M.L., "Small subunit ribosomal RNA^+ of *Hexamita inflata* and quest for the first branch in the eukaryotic tree", *Mol. Biochem. Parasitol*, **59:** 41-48, 1993.

Leitinger, B. y Brown, J.L., "Tagging secretory and membrane proteins with sulfation site", *J. Biol. Chem.,* **269:** 8115-8121, 1994.

Lewin, B., "Genes V", 2a, edición, Oxford University Press, Nueva York, 1995.

Lewis, M.J.; Sweet, D.J. y Pelham, B., "The ERD2 gene determines the specifity of the luminal ER protein retention system", *Cell,* **61:** 1359-1363, 1990.

——— y Pelham, H.R.B., "A human homologue of the yeast HDEL receptor", *Nature,* **348:** 162-163, 1990.

——— y Pelham, H.R.B., "SNARE-Mediated retrograde traffic from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum", *Cell,* **85:** 205-215, 1996.

Locker, K.J.; Opstelten, D.J.; Ericsson, M.; Horzinek, C. y Rottier, J.M., "Oligomerization of a trans-Golgi/trans-Golgi Network Retained Protein Occurs in the Golgi Complex and May Be Part of Its Retention", *J. Biol. Chem.*, **270(15):** 8815-8821, 1995.

Luján, H.D.; Marotta, A.; Mowatt, M.R.; Sciaky, A. y Lippincott-Schwartz, J., "Developmental induction of Golgi Structure and Function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*", *J. Biol. Chem.,* **270:** 4612-4618, 1995.

MacCaffery, M. y Gillin, F.D., "*Giardia lamblia*: ultrastructural basis of protein transport during growth and encystation", *Exp. Parasitol.,* **79:** 220-235, 1994.

Malhotra, V. y cols., "Role of an *N*-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack", *Cell,* **54:** 221-227, 1988.

Mandon, E.; Kempner, E.S. y cols., "A monomeric protein in the Golgi membrane catalyzes both *N*-acetylation and *N*-sulfation of heparan sulfate", *J. Biol. Chem.,* **269:** 11729-11733, 1994.

Mazzuco, A.; Benchimol, M. y De Souza, W., "Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*", *Micron,* **28:** 241-247, 1997.

Melancon, P. y cols., "Involvement of GTP-binding 'G' proteins in transport through the Golgi stack", *Cell,* **51:** 1053-1062, 1987.

Mercer, J.F.B.; Livingston, J.; All, B.; Paynter, J.A.; Begy, C. y Glover, T.W., "Isolation of a partial candidate for Menkes disease by positional cloning", *Nature Genet.,* **3:** 20-25, 1993.

Merry, D.E.; Janne, P.A.; Landers, J.E.; Lewis, R.A. y Nussbaum, R.L., "Isolation of a candidate gene for choroideremia", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., 2135-2139, 1992.

Misteli, T. y Warren, G., "Mitotic disassembly of the Golgi apparatus in vivo", *J. Cell Sci.,* **108:** 2715-2727, 1995.

Munro, S. y Pelham, H.R., "A C-terminal Signal Prevents Secretion of Luminal", *ER Proteins Cell,* **48:** 899, 1987.

Niehrs, C. y Beisswanger, R., "Protein tyrosine sulfation 1update", *Chem. Biol. Interact.,* **92:** 257-271, 1994.

Orci, L.B.; Glick, J. y Rothman. J.E., *Cell,* **46:** 171, 1986.

———— y cols., "Dissection of a single round of vesicular transport: sequential intermediates for intercisternal movement in the Golgi stack", *Cell,* **56:** 357-368, 1989.

Parodi, A.J., "*N*-glycosylation in trypanosomatid protozoa", *Glycobiology,* **3(3):** 193-199, 1993.

Paulson, J.C., *Trends Biochem. Sci.,* **14:** 272-275, 1984.

Pearse, B.M. y Robinson, M.S., "Clathrin adaptors and sorting", *Ann. Rev. Cell Biol.,* **6:** 151-171, 1990.

Petris, M.; Mercer, J.F.B.; Culvenor, J.G.; Lockhart, P.; Glesson, P.A. y Camakaris, J., "Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPasa from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking", *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **15:** 6084-6095, 1996.

Reaves, B. y Banting, G., "Pertubation of the morphology of the trans-Golgi network following brefeldin A treatment: redistribution of a TGN-specific integral membrane protein, TGN38", *J. Cell Biol.,* **116(1):** 85-94, 1992.

Reiner, D.S.; MacCaffery, M. y Gillin, F.D., "Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*", *Eur. J. Cell Biol.,* **53:** 142-153, 1990.

Rios, R. y Tassin, M., "A peripheral protein associates with the *cis*-Golgi network redistributes in intermediate compartment upon brefeldina A treatment", *J. Cell Biol.,* **125(5):** 997-1013, 1994.

Rothman, J.E., "The Golgi Apparatus: Two organelles in tandem", *Science,* **213:** 1212-1219, 1981.

————, "Organización compartimentada del aparato de Golgi", *Investigación y ciencia*, **110:** 48-63, 1985.

————, "Mechanisms of intracellular protein transport", *Nature,* **372:** 55-63, 1994.

———— y Wieland, F.T., "Protein sorting by transport vesicles" *Science,* **272:** 227-234, 1996.

Ryan, K.A.; Garraway, L.A.; Descoteaux, A.; Turco, S.J. y Beverley, S.M., "Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidyl-inositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **90:** 8609-8613, 1993.

Sánchez-López, R.; Gamma-Castro, S.; Ramos, M.A.; Merino, E.; Lizardi, P.M. y Alagón, A., "Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene", *Mol. Biochem. Parasitol.,* **92:** 355-359, 1998.

Schekman, R., "Translocation gets a push", *Cell,* **78:** 911-913, 1994.

———— y Orci, L., "Coat Proteins and Vesicle Budding", *Science,* 15; **271:** 1526-1533, 1996.

Schutze, M.P.; Peterson, P.A. y Jackson, M.R., "An *N*-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum", *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **13:** 1696-1705, 1994.

Scriver, Ch.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S. y Valle, D., *The metabolic and molecular bases of inherited disease,* en: Sabatini, D.D. y Adesnik, M., *The biogenesis of membranes and organelles*; Thomas, G.H. y Leaudet, A.L., *Disorders of glycoprotein degradation and structure α-mannosidosis, β-mannosidosis, fucosidosis, sialidosis, aspartilglucosaminuria, and carbohydrate-deficient glyco-*

protein syndrome; Charnas, L.R. y Nussbaum, R.L., *The oculocerebrorenal syndrome of Lowe (Lowe syndrome)*; Cremers, F.P.M. y Ropers, H.H., *Choroideremia*, 7a. edición, International Edition, Mc Graw-Hill, Inc., 1995.

Scriver, P. y cols., "The molecular y biochemical basis of human inherited disease", T-1, capítulo 8, "The biogenesis of membranes and organelles", 3a. edición, Mc Graw-Hill, Nueva York, 1993.

Semenza, J.C.; Hardwick, K.G.; Dean, N. y Pelham, H.R., "ERD2, a yeast gene required for the receptor mediated retrieval of luminal ER proteins from secretory pathway", *Cell,* **61:** 1349-1357, 1990.

Shapiro, S.Z. y Webster, P., "Coated vesicles from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*: purification and characterization", *J. Protozool.,* **36:** 344-349, 1989.

Shima y cols., "Investigation of Golgi inheritance during mitosis using a Golgi-localized GFP", *Mol. Biol. Cell. Suppl.,* **7:** 321, 1996.

Sogin, M.L.; Gunderson, J.H.; Elwood, H.J.; Alonso, R.A. y Peattie, D.A., "Phylogenetic Meaning of the Kingdom Concept: An Unusual Ribosomal RNA from *Giardia lamblia*", *Science,* **243:** 75-77, 1989.

Suchy, S.H.; Olivos-Galander, M. y Nussbaum, R.L., "Lowe syndrome, a deficiency of a phosphatidyl-inositol 4,5-biphosphate 5-phosphatase in the Golgi apparatus", *Hum. Mol. Genet.,* **4:** 2245-2250, 1995.

Svärd, S.G.; Rafferty, C.; McCaffery, J.M.; Smith, M.W.; Reiner, D.S. y Gillin, F.D., "A signal recognition particle receptor gene from the early-diverging eukaryote *Giardia lamblia"*, *Mol. Biochem. Parasitol.,* **98:** 253-264, 1999.

Vale, R.D.; Schnapp, B.J.; Reese, T.S. y Sheetz, M.P., "Organelle, Bead, and Microtubule Translocations Promoted by Soluble Factors from the Squid Giant Axon", *Cell,* **40:** 559, 1985.

Van den Hurk, J.A.J.M.; Van den Pol, T.J.R.; Molloy, C.M.; Brunsman, F.; Rüther, K.; Zrenner, E.; Weiringa, B.; Ropers, H.H. y Cremers, F.P.M., "Detection and characterization of point mutations in the choroideremia candidate gene by PCR-SSCP analysis and direct DNA sequencing", *Am. J. Hum. Genet.,* 1195-1202, 1992.

Waters, G.M.; Serafini, T. y Rothman J.E., "Coatomer: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles", *Nature,* **349:** 248-251, 1991.

Weidman, P., "Anterograde transport through the Golgi complex: do Golgi tubules hold the key?", *Trends in Cell Biology* **5:** 302-305, 1995.

Wright, A.F.; Nussbaum, R.L.; Bhattacharya, S.S.; Jay, M.; Lesko, J.G.; Evans, H.J. y Jay, B., "Linkage studies and deletion screening in choroideremia", *J. Med. Genet.,* **27:** 496-515, 1990.

Yun-Hy y Keutman, J., "Alternative splicing governs sulfation tyrosine or oligosaccharide on peptidilglycine a-amidating mono-oxigenasa", *Biol. Chem.,* **269:** 10946-10955, 1994.

Zaal, K.J.; Smith, C.L.; Polishchuc, R.S.; Altan, N.; Cole, N.B.; Ellenberg, J.; Hirschberg, K.; Presley, J.F.; Roberts, T.H.; Siggia, E.; Phair, R.D. y Lippincott-Schwartz, J., "Golgi membranes are absorbed into and remerge from the ER during mitosis", *Cell* 10; **99(6):** 589-601, 1999.

——— y cols., "Diffusional mobility of Golgi proteins in mitotic cells", *Mol. Biol. Cell. Suppl.,* **7:** 321, 1996.

Zhang, X.; Jefferson, A.B.; Auethavekiat, V. y Majerus, P.W., "The protein deficient in Lowe syndrome is a phosophatidylinositol-4, 5-biphsophate 5-phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **92:** 4853, 1995.

CAPÍTULO 16

LISOSOMAS

Alfonso González-Noriega



Características generales

Los lisosomas (partículas líticas) inicialmente fueron reconocidos bioquímicamente como vesículas que contienen enzimas hidrolíticas cuyo pH óptimo es ácido (4.8 a 5.2). En la actualidad han sido identificadas alrededor de 50 hidrolasas ácidas entre las que se encuentran: fosfatasas, nucleasas. Los lisosomas tienen capacidad de hidrolizar casi cualquier tipo de partícula biológica extracelular, capturada por la célula por endocitosis, o bien intracelularmente por autofagia. La degradación de micromoléculas en sus componentes y la transferencia de éstos al citoplasma, permite a la célula su reutilización para sintetizar nuevas macromoléculas. Una célula puede contener varios cientos de vacuolas lisosomales, las cuales son variables en su tamaño, forma y contenido. La apariencia del lisosoma refleja la naturaleza del material que contienen y que está en proceso de digestión; en ellos se pueden observar desde materiales recién ingeridos, cuyo origen puede ser fácilmente reconocido, hasta residuos que no pueden ser digeridos. Esta heterogeneidad contrasta con la estructura uniforme de otros orgánulos celulares, de forma que su polimorfismo casi ha llegado a convertirse en una distinción para los lisosomas. Al contrario de otros organelos subcelulares, los lisosomas no pueden identificarse por criterios morfológicos habituales de tamaño, forma y estructura interna, ya que en su interior no se detecta ninguna estructura fina. Los lisosomas se deben identificar con el microscopio electrónico en base a los criterios que los definen; esto es, como vesículas formadas por una membrana simple, cuyo tamaño es variable (0.2 a 2 nm) y que presentan una reacción positiva a tinciones citoquímicas específicas para hidrolasas ácidas.

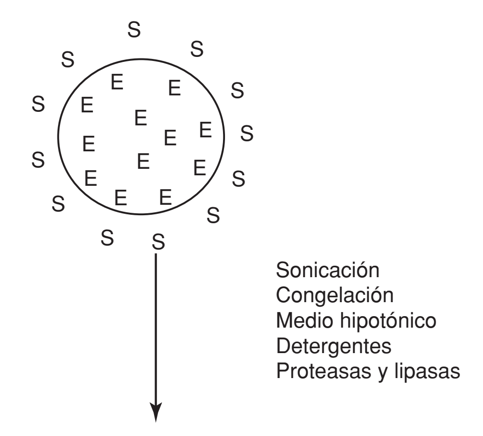
> Los lisosomas tienen capacidad de hidrolizar casi cualquier tipo de partícula biológica extracelular, capturada por la célula por endocitosis, o bien intracelularmente por autofagia.

Descubrimiento

Los lisosomas fueron descubiertos por De Duve y colaboradores (1949) en la Universidad de Lovaina (Bélgica) gracias a un conjunto de circunstancias

poco comunes en torno a estudios que se realizaron para conocer la localización intracelular de la glucosa-6-fosfatasa, enzima que se pensaba desempeñaba un papel en el mecanismo de acción de la insulina en el hígado. El grupo de De Duve encontró que esta fosfatasa, a diferencia de otras, opera a un pH óptimo ligeramente ácido. Su máxima actividad se obtuvo cuando la enzima fue extraída al lisar el tejido en forma drástica en una licuadora en presencia de agua destilada (medio hipotónico); por el contrario, únicamente se obtuvo 10% de la actividad esperada si el tejido era lisado en un medio isotónico como es 0.25% de sacarosa, utilizando un homogeneizador. Sin embargo, las preparaciones obtenidas por rompimiento suave del tejido, al ser guardadas en refrigeración durante una semana, recuperaban la actividad máxima esperada. Este tipo de observaciones permitieron pensar que, dependiendo de las condiciones de ruptura del tejido, la actividad de la enzima puede quedar enmascarada. Bastaron algunos meses de trabajo para determinar que la latencia observada en la actividad de la fosfatasa ácida era debida a que la enzima estaba encapsulada por una membrana impermeable al sustrato de la enzima. Esta estructura es capaz de romperse por acción mecánica, choque hipotónico, por congelación y descongelación o bien por solubilización con detergentes; por ello, la lisis de estos sacos permite un libre acceso de la enzima a su sustrato y, por ende, obtener una máxima actividad de la enzima (figura 16-1).

(a) Homogenización suave
(lisosomas intactos)



(b) Homogenización drástica
(lisosomas dañados)

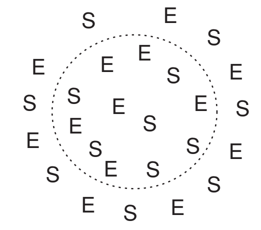


Figura 16-1. Representación de la latencia de las hidrolasas ácidas.

Paralelamente, la manufactura de las primeras ultracentrífugas permitió al grupo de De Duve, mediante centrifugación diferencial, sedimentar secuencialmente y en orden decreciente de su densidad: núcleos, mitocondrias y microsomas de células lisadas en presencia de sacarosa, 0.25 M. Los primeros estudios de fraccionamiento subcelular sugirieron que la fosfatasa ácida estaba asociada a mitocondria. Posteriormente, al manipular las condiciones de centrifugación, la fracción mitocondrial obtenida a partir de preparaciones de hígado homogeneizado en presencia de 0.25 M de sacarosa, se pudo subdividir en una fracción pesada y otra ligera. En la primera se pudieron encontrar actividades típicas de mitocondrias (cuyo pH óptimo es neutro) y en la segunda la actividad latente para la fosfatasa ácida. La fracción enriquecida para lisosomas, teñida con el método de Gomori para fosfatasa ácida, permitió por primera vez a De Duve y Novikoff (1956) observar con el microscopio electrónico los lisosomas y describirlos como cuerpos densos de 0.25 a 0.5 μm con una cavidad interna y una membrana externa.

El concepto sobre la función digestiva de los lisosomas fue desarrollado por Straus (1954), al encontrar la capacidad de los lisosomas para degradar compuestos endocitados por la célula. Utilizando métodos citoquímicos, observó que las partículas y proteínas endocitadas se acumulan primero en vesículas que denominó fagosomas, las cuales posteriormente se fusionan con vesículas lisosomales (que contienen hidrolasas ácidas) para formar vesículas digestivas que denominó fagolisosomas. La coexistencia en una misma vesícula de enzimas tales como proteasas, ribonucleasas y glicosidasas, como de partículas externas que han sido endocitadas, permitió inferir que la función de los lisosomas es digerir partículas externas. Siguiendo esta línea de investigación, los trabajos de Cohn y sus colaboradores en el Instituto Rockefeller (1960) permitieron entender la forma en que los lisosomas participan en la digestión del material fagocitado por células, que podemos llamar típicamente fagocíticas, como pueden ser los neutrófilos y los macrófagos. Utilizando métodos citoquímicos, mostraron que los gránulos neutrófilos presentes en leucocitos corresponden a lisosomas y que estos gránulos descargan su contenido en las vacuolas fagocíticas cuando las células ingieren bacterias y otro tipo de partículas. Paralelamente, Cohn y cols. incorporaron marcadores radiactivos a lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos de bacterias, las cuales fueron fagocitadas por cultivos primarios de neutrófilos o macrófagos. En el medio de cultivo se aislaron los productos radiactivos resultantes de la degradación de las bacterias fagocitadas.

La mayoría de estos trabajos realizados en células fagocíticas amiboides permitió reanalizar y dar la importancia debida a los trabajos del zoólogo ruso Metchnikoff, quien en 1883 describió por primera vez el fenómeno de fagocitosis. Este investigador descubrió la existencia de células móviles en larvas de estrellas de mar, las cuales son capaces de ingerir y destruir bacterias. Además, Metchnikoff, utilizando un indicador de pH como es el tornasol, pudo establecer que la digestión de las partículas ingeridas, tanto por estas células como por amibas y macrófagos, se lleva a cabo en vesículas digestivas que tienen un pH ácido y que deben contener compuestos digesti-

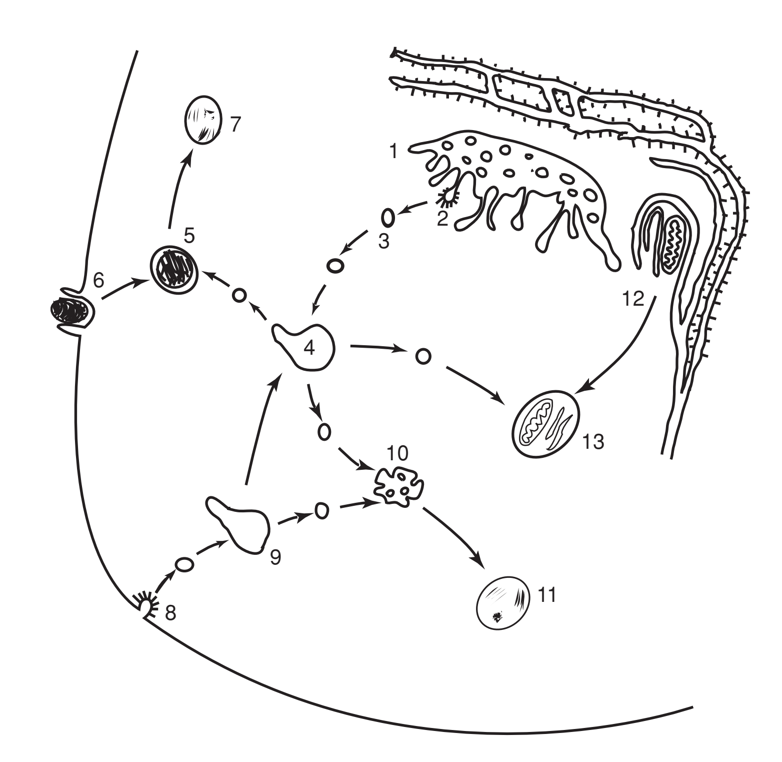
vos a los que llamó citasas. Hoy en día, la presencia de hidrolasas ácidas en vacuolas que tienen un pH ácido es requisito indispensable para definir a un lisosoma (Bainton, 1982; Brodosky, 1988).



Clasificación funcional de lisosomas y de partículas relacionadas

Una década después del primer informe bioquímico, los lisosomas fueron identificados mediante métodos citoquímicos aplicados a microscopia electrónica. El estudio de células provenientes de diferentes tejidos permitió a Novikoff detectar diversos tipos de vesículas que tiñen positivamente para la fosfatasa ácida (marcador de lisosomas) y, en consecuencia, sugerir nuevos aspectos de la función digestiva de los lisosomas (figura 16-2). Desde el primer momento llamó la atención a Novikoff la heterogeneidad en el tamaño y el contenido de las vesículas que forman parte del sistema lisosomal, la cual contrasta con la ultraestructura relativamente uniforme de otros organelos celulares. Esta diversidad sugirió a Novikoff que los lisosomas son heterogéneos en cuanto a su función digestiva y su conjunto puede ser considerado como un organelo celular, el cual funcionaría como un sistema digestivo intracelular, comparable, excepto por su discontinuidad, con el tracto digestivo de organismos superiores. Cada vacuola correspondería a un segmento dado del tracto digestivo, en que el material que va a ser digerido puede ser de origen endógeno o exógeno.

Como resultado de los trabajos hasta ahora reseñados, hubo una aceptación generalizada de que el sistema lisosomal estaba formado por una fami-



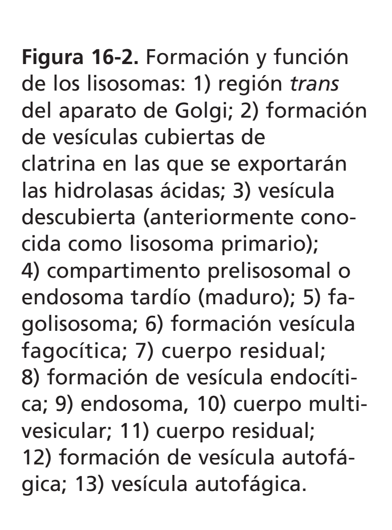


Figura 16-2. Formación y función de los lisosomas: 1) región *trans* del aparato de Golgi; 2) formación de vesículas cubiertas de clatrina en las que se exportarán las hidrolasas ácidas; 3) vesícula descubierta (anteriormente conocida como lisosoma primario); 4) compartimento prelisosomal o endosoma tardío (maduro); 5) fagolisosoma; 6) formación vesícula fagocítica; 7) cuerpo residual; 8) formación de vesícula endocítica; 9) endosoma, 10) cuerpo multivesicular; 11) cuerpo residual; 12) formación de vesícula autofágica; 13) vesícula autofágica.

lia de vesículas bien definida. La relación entre un tipo de vesículas y otra, así como su función, fue descubriéndose en los siguientes años. (Brown y Goldstein, 1976; Brown y cols., 1986; Dahms y cols., 1989; De Duve, 1985; Dice, 1992; Dumn, 1990).

Lisosomas primarios

Son vesículas que se forman a partir del aparato de Golgi, contienen únicamente hidrolasas ácidas y tienen la propiedad de fusionarse con diversos tipos de vesículas fagocíticas. En general, es difícil observar a los lisosomas primarios, ya que son pequeñas vesículas que, tan pronto se forman, se fusionan con vesículas que contienen los sustratos que deben ser catabolizados. Las nuevas vesículas formadas, que contienen tanto las hidrolasas ácidas como los materiales que van a ser degradados, se denominaron genéricamente lisosomas secundarios. Únicamente los lisosomas primarios pueden observarse con cierta facilidad en leucocitos y particularmente en neutrófilos, eosinófilos y monocitos. Durante la etapa de maduración de estas células, las hidrolasas ácidas se acumulan en lisosomas primarios, los cuales se pueden teñir con Giemsa y son conocidos como gránulos azurófilos o eosinófilos. En estos tipos celulares, se puede observar que la fusión de lisosomas a las vesículas fagocíticas genera una degranulación de la célula.

Vesículas autofágicas

Este tipo de vesículas se pueden identificar fácilmente con el microscopio electrónico, porque en su interior se pueden observar mitocondrias, retículo endoplásmico, glucógeno y otros tipos de entidades citoplásmicas con varios grados de desorganización. Se piensa que las vesículas autofágicas se forman a partir de membranas del retículo endoplásmico que contienen fosfatasa ácida. Estas membranas envuelven a aquellas partículas que van a ser degradadas. Inicialmente estas vesículas (autofagosomas) no contienen enzimas lisosomales; posteriormente, a ellas se les fusionan lisosomas, con lo cual se inicia la degradación del contenido de las vesículas autofágicas; estas nuevas vesículas se conocen como autofagolisosomas. El proceso de autofagia ocurre constantemente en todo tipo celular, por lo que tiene un papel importante en el proceso de recambio que sufren tanto proteínas como organelos. El proceso de autofagocitosis puede ser incrementado en condiciones fisiológicas o bien patológicas. Un incremento en el número de vesículas autofagocíticas que encapsulan de forma específica glucógeno, se puede observar cuando el hígado es estimulado con glucagón, con lo cual se estimula la degradación de glucógeno. Un ejemplo de una condición patológica ocurre cuando se somete a las células a un ayuno importante de aminoácidos, lo cual trae como consecuencia un deterioro de organelos celulares y su encapsulación en vesículas autofágicas. Éste sería uno de los mecanismos que la célula posee para incrementar la degradación de proteínas,

Las vesículas autofágicas se pueden identificar fácilmente con el microscopio electrónico, porque en su interior se pueden observar mitocondrias, retículo endoplásmico, glucógeno y otros tipos de entidades citoplásmicas con varios grados de desorganización.

generando aminoácidos que son utilizados como fuente de energía o para las síntesis de proteínas.

Fagolisosomas

A este tipo de vesículas también se les conoce como heterofágicas, para distinguirlas de las autofágicas. Contienen, además de las enzimas lisosomales, partículas ajenas a la célula que han sido capturadas por un proceso de fagocitosis. Mientras que las vesículas autofágicas se pueden encontrar en todo tipo de células, las vesículas heterofágicas se encuentran en células fagocíticas profesionales, como son los monocitos, macrófagos, células de Kupffer, etc. La formación del fagolisosoma reviste una gran importancia, ya que éste es un mecanismo de defensa que el organismo posee para eliminar virus, bacterias, parásitos unicelulares, células cancerígenas, partículas microscópicas, etc., que penetran en él por diferentes vías. Inicialmente Straus denominó como fagolisosoma a toda vesícula que se forma por la fusión de lisosomas primarios con cualquier tipo de vesícula endocítica; en la actualidad se reserva este término para definir únicamente aquellas vesículas que se forman por un proceso de fagocitosis y a las cuales se fusionan lisosomas.

Endosomas

La pinocitosis es un mecanismo muy importante que la célula posee para transportar a su interior sustancias solubles extracelulares.

La pinocitosis es un mecanismo muy importante que la célula posee para transportar a su interior sustancias solubles extracelulares, tales como hormonas, factores de crecimiento, proteínas séricas, mucopolisacáridos, lipoproteínas, etc. Las vesículas endocíticas que se forman (pinosomas) se fusionan con vesículas que tienen una forma tubular, las cuales se conocen como endosomas, receptosomas o prelisosomas. Estas vesículas se distinguen por su morfología, por ser menos densas que los lisosomas y por ser un compartimento ligeramente ácido (pH 6 a 6.2). Esta característica permite que aquellas proteínas que han sufrido endocitosis vía receptores específicos sean disociadas y queden dentro de la vesícula como proteínas solubles; de esta forma, los receptores libres son reciclados a la membrana extracelular en pequeñas vesículas y el material soluble es acarreado a los lisosomas secundarios.

Cuerpos multivesiculares

Con el microscopio electrónico se distinguen fácilmente, ya que son vacuolas en las que en su lumen se pueden distinguir vesículas más pequeñas. Debido a que su pH es ligeramente ácido (pH 5.5 a 6) y contienen hidrolasas ácidas, son considerados como lisosomas secundarios. Los cuerpos multivesiculares se forman cuando ciertos pinosomas, al fusionarse con la membrana del endosoma, se invaginan y vesiculan hacia el lumen de la vesícula; así, en esta vesícula evertida, los componentes de la membrana, que

antes estaban en contacto con el lumen de la vesícula pinocítica, ahora están en contacto con el lumen de la vesícula multivesicular. Se ha observado que las vesículas pinocíticas que son secuestradas en los cuerpos multivesiculares contienen receptores a los cuales se les ha unido su hormona. Mediante este mecanismo, el complejo receptor-hormona, al llegar a un compartimento acídico, se disocia, pero, a diferencia de lo que pasa con un receptor que llega a un endosoma donde queda atrapado, no puede ser reciclado a la membrana y es degradado. De esta forma, la célula no puede volver a ser estimulada por un tiempo.

Cuerpos residuales

En el lumen de este tipo de vesículas se observa una estructura polimórfica electrodensa compuesta por residuos no digeridos por los lisosomas. El contenido de estas vesículas puede ser eliminado por las células mediante un mecanismo de exocitosis, pero los residuos no digeridos nunca se han visto libres en el citosol. En hígado, la secreción ocurre hacia los conductos biliares, o hacia los túbulos en el riñón. En otros tipos celulares no es seguro que se lleve a cabo la descarga de los residuos de la digestión lisosomal. Algunos cuerpos residuales son negativos para la tinción de fosfatasa ácida y para otras enzimas lisosomales, por lo cual se les considera como poslisosomas.



Capacidad digestiva de los lisosomas

Hasta el momento, nos hemos referido a la capacidad de los lisosomas para digerir microorganismos y macromoléculas exógenas que han sido capturadas por un proceso de endocitosis, o bien componentes endógenos por autofagia. Sin embargo, las enzimas lisosomales pueden ejercer su capacidad digestiva extracelularmente; para ello, las hidrolasas ácidas deben ser excretadas por exocitosis y degradar algunos componentes extracelulares. De esta forma su acción hidrolítica interviene en el recambio de las matrices extracelulares, la reabsorción y formación del tejido óseo, en el proceso de fecundación del óvulo, durante determinadas etapas de la morfogénesis en las que hay invasión celular, etc.

En condiciones normales, las hidrolasas ácidas hidrolizan las macromoléculas, liberando los componentes que las conforman, los productos liberados pueden ser transportados al citoplasma a través de la membrana lisosomal. Las macromoléculas que no son catabolizadas o los productos que no son transportados a través de la membrana, se van depositando en la vesícula hasta producir un lisosoma que no es capaz de digerir más compuestos; de esta manera se forman las vesículas residuales. También se puede observar un acúmulo intralisosomal en condiciones patológicas en las que haya una ausencia en la actividad de una hidrolasa ácida. Tales condiciones se presentan en aquellos pacientes que presentan alteraciones congénitas debido a mutaciones en genes que codifican para alguna de las

hidrolasas ácidas, o bien cuando se ha ingerido alguna droga que inhiba la actividad de una o varias de estas enzimas. En ambos casos, los sustratos que no pueden ser catabolizados se acumularán dentro del lisosoma, causando un almacenamiento anómalo que produce un incremento en el tamaño de los mismos, citotoxicidad, malformaciones, retardo mental y aun la muerte temprana del individuo.

En la actualidad se han descrito alrededor de 50 hidrolasas ácidas, entre las que se encuentran proteasas, glicosidasas, lipasas, nucleasas, fosfatasas y sulfatasas, además de una serie de proteínas que modulan la acción de alguna de estas enzimas. Varios tipos de enfoques han permitido entender cómo los lisosomas llevan a cabo su función:

a) Incorporación de moléculas definidas marcadas radiactivamente y estudio en diferentes tiempos de los productos de degradación que se generan y que permanecen dentro de los lisosomas, así como aquellos que han sido transportados fuera de la vesícula lisosomal.
b) Caracterización de productos originados de la digestión de sustratos definidos por lisosomas purificados.
c) Caracterización de los sustratos acumulados en lisosomas y de los que se excretan orina en pacientes con errores innatos del metabolismo deficientes para alguna enzima lisosomal.
d) Purificación y caracterización de hidrolasas ácidas.

En la tabla 16-1 se enumeran por familias, según su actividad, algunas de las principales hidrolasas presentes en los lisosomas. El grupo de hidrolasas ácidas mejor estudiadas es el de las glicosidasas, el cual está compuesto por aproximadamente 15 enzimas lisosomales involucradas en la degradación de glucógeno intracelular, mucopolisacáridos presentes en la lámina basal, cartílago, líquido sinovial, etc., de cadenas glicosídicas presentes en glicoproteínas y de glicolípidos solubles o que forman parte de las membranas celulares. Casi todas las enzimas de este grupo son exoglicosidasas, es decir, cortan únicamente la unión glicosídica de los azúcares terminales, por lo que deben actuar en forma secuencial (figura 16-3). Si hay una carencia para alguna de estas exoglicosidasas, el resto de las glicosidasas, aun cuando estén presentes, no podrán seguir degradando un determinado oligosacárido. Todas estas enzimas son sumamente específicas, esto es, una α-galactosidasa no podrá reconocer a una β-galactosidasa terminal de una cadena de oligosácaridos. Se han descrito dos endoglicosidasas presentes en prácticamente todos los seres vivos: la hialuronidasa y la lisozima; la primera es capaz de cortar en fragmentos cadenas extracelulares de mucopolisacáridos como paso previo para su endocitosis y degradación en lisosomas secundarios. La lisozima es una endoglicosidasa, presente en prácticamente todo tipo de microorganismos, que hidroliza la unión entre acetilmurámico y *N*-acetil-glucosamina presente en proteinglicanos de la pared de un sinnúmero de bacterias. Por otra parte, se han descrito otro tipo de endoglicosidasas que sólo ciertas bacterias las producen (endoglicosidasa H, D, F, etc.) y que tienen en común separar en forma muy específica

Figura 16-3. Representación esquemática de la degradación de una cadena de mucopolisacárido (dermatán-sulfato). Este heteropolímero está formado por ácido idurónico y glucurónico, así como *N*-acetil-glucosamina. Las hidrolasas ácidas que intervienen en su degradación actúan en forma secuencial: E1, iduronato-sulfatasa; E2, α-L-iduronato; E3, galactosamina-4-sulfatasa; E4, *N*-acetil-galactosaminidasa; E5, β-glucuronidasa.

las cadenas glicosídicas presentes en glicoproteínas y que están unidas a residuos de asparagina. Dentro del grupo de las glicosidasas se pueden considerar las sulfatasas (arilsulfatasas); estas hidrolasas ácidas hidrolizan a grupos arilo presentes en azúcares de mucopolisacáridos; la especificidad de este tipo de enzimas está dada por el azúcar que contiene al arilo y el carbono al cual se une el arilo.

Para conocer a qué tipo de sacáridos es permeable la membrana lisosomal, se han expuesto macrófagos en cultivo a una serie de azúcares. Se ha comprobado que únicamente monosacáridos pueden cruzar la pared de los lisosomas; en cambio, la sacarosa y otros sacáridos como celobiosa, trealosa, etc., al no poder cruzar la pared lisosomal y no ser catabolizados, causan la formación de grandes vacuolas translúcidas, que corresponden a lisosomas secundarios que se llenan con estos compuestos después ser endocitados. Las vacuolas desaparecen en el momento que se añaden exógenamente las enzimas que pueden degradar estos productos, ya que, tras ser endocitadas, llegan al lisosoma en donde pueden degradar a sus sustratos. Así, en el caso de sacarosa, la adición de invertasa trae como consecuencia la desaparición de las vacuolas y la excreción al medio de fructuosa y glucosa.

Tabla 16-1.

Hidrolasas ácidas involucradas en la digestión de macromoléculas	
A. Glicosidasas. Grupo de enzimas lisosomales involucradas en la degradación de cadenas glicosídicas presentes en: glicoproteínas, esfingolípidos, glucógeno o mucopolisacáridos.	
1. Exoglicosidasas	*2. Endoglicosidasas*
α-Glucosidasa	Hialuronidasa
β-Glucosidasa	Lisozima
β-Xilosidasa	Endo-β-*N*-acetilglucosaminidasa
α-Galactosidasa	Aspartil-glucosaminidasa
β-Galactosidasa	
β-Fucosidasa	*3. Sulfatasas*
α-Fucosidasa	Aril-sulfatasa A
α-Manosidasa	Aril-sulfatasa B
β-Glucuronidasa	α-Iduronidato-sulfato-sulfatasa
α-Iduronidasa	*N*-Acetil-α-glucosaminido-sulfato-sulfatasa
N-Acetil-β-hexosaminidasa	*N*-Acetil-α-galactosaminido-sulfato-sulfatasa
N-Acetil-α-glucosaminidasa	
N- Acetil-α-galactosaminidasa	
Neuroaminidasa (sialidasa)	
Galactocerebrosidasa	
B. Proteasas. Grupo de enzimas lisosomales involucradas en la hidrólisis de cadenas peptídicas.	
1. Endopeptidasas	*3. Carboxipeptidasas*
Catepsina B	Catepsina A
Catepsina D	Catepsina IV
	Carboxipeptidasa ácida
2. Aminopeptidasas	
Catepsina C	
Dipeptidilamino-peptidasa II	
C. Lipasas. Grupo de enzimas que hidrolizan esfingolípidos, ésteres de ácidos grasos y fosfoglicéridos.	
Galactosilceraminidasa	
Esfingomielinasa	
Lipasa ácida	
Ceraminidasa	
Estearasa	
D. Fosfatasas. Hidrolizan grupos fosfato presentes en ácidos nucleicos, proteínas, lípidos o carbohidratos.	
Fosfatasa ácida	
Esfingo-fosfodiesterasa	
Fosfolipasas	
Exonucleasa ácida	
Nucleotidasa ácida	
E. Nucleotidasas. Hidrolizan ácidos nucleicos.	
Endonucleasas	
Desoxirribonucleasa	
Ribonucleasa	

La digestión de proteínas y péptidos se lleva a cabo mediante la acción simultánea de endo- y exopeptidasas, las cuales liberan como productos finales dipéptidos y aminoácidos (figura 16-4). Se ha comprobado que todos los aminoácidos libres pueden cruzar la pared de los lisosomas para ser reutilizados en el citoplasma; para los dipéptidos, la permeabilidad de la membrana lisosomal aparentemente depende de su tamaño y carga. Aunque las

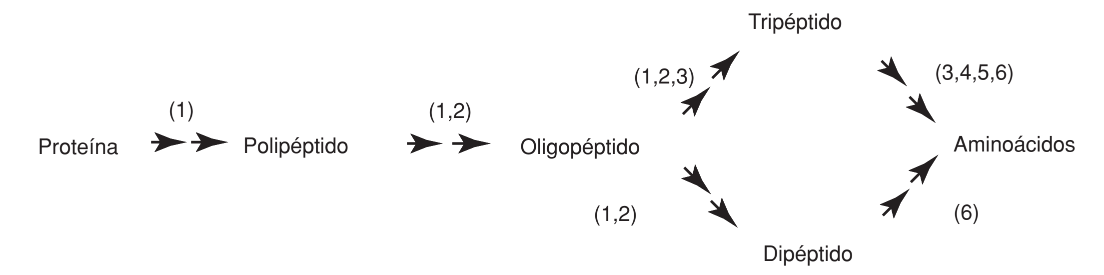


Figura 16-4. Hidrólisis secuencial de proteínas y péptidos por enzimas lisosomales. 1 Endopeptidasas: catepsina B y catepsina D. 2 Aminopeptidasa (catepsina C). 3 Carboxipeptidasas (catepsina A y IV). 4 Carboxipeptidasa ácida. 5 Dipeptidilamino-peptidasa II. 6 Dipeptidasas.

proteasas actúan principalmente dentro de los lisosomas, han sido involucradas en la degradación de proteínas presentes en matrices extracelulares tales como proteinglicanos presentes en el cartílago, elastina y colágena presentes en el tejido conectivo. En cuanto al catabolismo de lípidos, se ha descrito que las grasas neutras y fosfolípidos son degradados a ácidos grasos y glicerol o glicerofosfodiésteres, los esfingolípidos a esfingosina, ácidos grasos, fosfato inorgánico, colina y monosacáridos libres. El colesterol, que es transportado en el suero como ésteres de colesterol en lipoproteínas, es liberado en lisosomas y transportado al citoplasma. Por último, el catabolismo de DNA y RNA se lleva a cabo en dos pasos: primero, por medio de endonucleasas, se pueden detectar oligonucleótidos, posteriormente aparecen purinas, pirimidinas y fosfato inorgánico. La desoxirribonucleasa genera oligonucleótidos que contienen de 10 a 12 nucleótidos, se ha encontrado que en 80% de las cadenas formadas el 3'-nucleótido fosforilado es una purina. Las exonucleotidasas presentes tienen una amplia especificidad; identifican el extremo 5'-hidroxi y liberan 3'-fosfonucleótidos. Otros nucleósidos trifosfato (ATP) son convertidos a nucleósidos monofosfatados por acción de una fosfodiesterasa; después, una fosfatasa hidroliza el último fosfato.

La capacidad digestiva de los lisosomas presenta una paradoja, ya que, mientras que proteínas añadidas exógenamente a macrófagos son capturadas y degradadas en los lisosomas en cuestión de minutos, se ha notificado que la vida media de las hidrolasas ácidas y de los componentes de la membrana del lisosoma fluctúa desde varias horas hasta varios días. Esta resistencia a degradación por autodigestión evita a la célula un gasto en cuanto a energía y precursores necesarios para mantener un nivel constante de las enzimas lisosomales y sus membranas por medio de síntesis *de novo* de sus componentes. Por otra parte, la estabilidad de los componentes membranales evita que las hidrolasas ácidas escapen al citosol, degradando otros componentes celulares. Al presente, no hay una respuesta contundente a esta cuestión, ya que no se ha encontrado en las hidrolasas ácidas ninguna estructura fuera de lo común, salvo su contenido glicosídico que podría retardar su degradación por acción de las proteasas. En cuanto a la superficie luminal de las membranas de los lisosomas, se piensa que está protegida de la acción digestiva de las hidrolasas ácidas debido a la presencia en las glicoproteínas de la membrana lisosomal de un número importante de cadenas

de oligosacáridos ricos en polilactosaminas que contienen ácido siálico. El contenido de azúcares en algunas de las glicoproteínas integrales de la membrana lisosomal llega a presentar aproximadamente 65% de la masa de la proteína (Fisher y cols., 1980; González-Noriega y cols.,1980; Griffiths y Gruenber, 1991; Harikumar y Reeves, 1991); Helenius y cols., 1983.

Acidificación de lisosomas y endosomas

En células de eucariontes, el espacio interior de endosomas, lisosomas y fagolisosomas se mantiene a un pH considerablemente más ácido que el pH del citosol o del espacio extracelular.

En células de eucariontes, el espacio interior de endosomas, lisosomas y fagolisosomas se mantiene a un pH considerablemente más ácido que el pH del citosol o del espacio extracelular. El pH acídico de vesículas con capacidad degradativa fue descrito por primera vez por Metchnikoff utilizando colorantes sensibles al pH que pueden ser atrapados por estas vesículas. Hoy en día es ampliamente utilizado el naranja de acridina, producto fluorescente que contiene una amina terciaria capaz de ser protonada. La fluorescencia de las vesículas intracelulares que contienen el naranja de acridina puede ser abolida utilizando ionóforos específicos o altas concentraciones de aminas terciarias. Las primeras evidencias que apoyaron la presencia de una bomba de protones como responsable para generar un pH de 4.5 a 5.2 en lisosomas, fueron en el sentido de que la acidificación es dependiente de la hidrólisis de ATP en presencia de magnesio y que la acidificación se puede llevar a cabo en ausencia de otros iones o en presencia de drogas que inhiben a otras bombas de iones.

La acidificación de los organelos intracelulares es mediada por una bomba de protones electrogénica, llamada bomba vacuolar de protones, o ATPasa tipo V para H^+.

La acidificación de los organelos intracelulares es mediada por una bomba de protones electrogénica, llamada bomba vacuolar de protones, o ATPasa tipo V para H^+. Esta bomba transporta en contra de gradiente protones presentes en citosol. La bomba vacuolar de protones es una proteína integral de membrana, compuesta por lo menos por nueve subunidades, que en su conjunto tienen un tamaño de 750 kDa. La concentración de protones en lisosoma es al menos cien veces mayor que en el citosol. Esta bomba en su estructura es muy similar a la F_0F_1ATPasa de mitocondria que funciona como una ATP-sintetasa. La bomba lisosomal se parece también a otras ATPasas (conocidas como ATPasas vacuolares) que han sido identificadas en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y endosomas debido a que son responsables de una acidificación progresiva del lumen de los organelos que forman el sistema endomembranal de la célula. Estas ATPasas tienen en común que son inhibidas por bafilomicina A, pero son insensibles a azida de sodio o a DCCC que inhibe la F_0F_1ATPasa de mitocondria, o a vanadato que inhibe la Na^+/K^+-ATPasa.

La bomba vacuolar de protones ha sido purificada a partir de hongos, plantas superiores y diversos mamíferos. Esta bomba está presente en lisosomas, endosomas y vacuolas de plantas. También se ha descrito en la membrana plasmática de osteoclastos y en algunas regiones de los túbulos del riñón. En este tipo de células, los protones son bombeados al exterior de la célula por medio de la bomba dependiente de ATP; así mismo, hay un transporte facilitado de Cl^-. La secreción de HCl sirve para disolver los cristales de fosfato de calcio que dan rigidez al hueso. En el segundo caso, ayudan a acidificar la orina (Helenius y cols., 1983; Hers, Van Hoof, 1973; Kornfeld, 1992; Kornfeld, 1992).



Biogénesis de los lisosomas

Como ya se ha mencionado, los lisosomas contienen una variedad de hidrolasas ácidas que están separadas de otros componentes citoplásmicos por una membrana. Esta membrana tiene diferentes funciones: la formación de una barrera resistente a la acción de las hidrolasas ácidas, la generación de un *milieu* intracelular ácido y el transporte selectivo de productos de degradación al citosol. La biogénesis de nuevos lisosomas y la reposición de componentes lisosomales requiere de una sustitución continua de componentes sintetizados *de novo*.

Tanto los componentes solubles como membranales de los lisosomas son sintetizados en el retículo endoplásmico, transportados al aparato de Golgi, segregados de otras proteínas e incorporados a lisosomas en formación (Kornfeld, 1992; Kornfeld, y Mellman, 1989; Lloyd y Mason, 1996; Murphy, 1991; Neufeld y cols., 1975; Novikoff, 1976; Pastan y Willingham, 1983; Pears y Robinson, 1990; Robinson, 1992; Robinson y Depta, 1988; Rodman, J.J. y cols., 1990; Rouslahti, 1988; Rudnick, 1986 y Sandoval y cols., 1994).

> Los componentes de los lisosomas son sintetizados en el retículo endoplásmico, transportados al aparato de Golgi, segregados de otras proteínas e incorporados a lisosomas en formación.

Proteínas lisosomales solubles

El estudio de pacientes con la enfermedad de células "I" (mucolipidosis II) ha desempeñado un papel importante en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la segregación y transporte de las hidrolasas ácidas a los lisosomas. Estos pacientes al no poder catabolizar adecuadamente mucopolisacáridos y esfingolípidos presentan un deterioro progresivo y degenerativo del sistema nervioso central esqueleto, tejido conjuntivo y epitelial, que se traduce en malformaciones, retraso mental, hepatoesplenomegalia, problemas circulatorios y respiratorios que producen la muerte del individuo a los 2 o 3 años de edad. Inicialmente se observó que los cultivos de fibroblastos, provenientes de estos pacientes, son deficientes para las hidrolasas lisosomales y en el medio en que se cultivan se encuentran niveles anormalmente elevados de prácticamente todas las enzimas lisosomales. En contraste con fibroblastos normales provenientes de varias especies, en fibroblastos de células "I", prácticamente todas las hidrolasas ácidas sintetizadas *de novo* no son transportadas a los lisosomas debido a que son secretadas junto con el resto de proteínas secretorias al medio. Posteriormente, se encontró que las hidrolasas secretadas por fibroblastos normales pueden ser recapturadas (endocitadas) de igual manera por fibroblastos normales que por fibroblastos de células "I". En contraste, las hidrolasas lisosomales secretadas por fibroblastos de células "I" no pueden ser endocitadas por ningún tipo de fibroblasto. Este tipo de observaciones permitió inferir a la Dra. E. Neufeld en la década de 1970, que el defecto en células "I" reside en la incapacidad de incorporar un marcador de reconocimiento a las enzimas lisosomales necesario para su recaptura y llegada a lisosomas. Por otra parte, dado que prácticamente todas las enzimas lisosomales sintetizadas por fibroblastos de células "I" son secretadas en forma anómala y no pueden ser recapturadas, se pensó que el marcador de reconocimiento debe ser común a todas las enzimas lisosomales.

Diez años después, en el laboratorio del Dr. W. Sly, se encontró que el marcador de reconocimiento es un residuo de manosa-6-fosfato presente en las cadenas glicosídicas de las proteínas solubles de los lisosomas. Una vez que se reconoció la naturaleza del marcador de reconocimiento, añadiendo manosa-6-fosfato a cultivos de fibroblastos, se pudo bloquear la recaptura de enzimas lisosomales sin afectar su secreción; de esta manera, se pudo cuantificar la cantidad de hidrolasas ácidas que son secretadas en condiciones normales, encontrándose que es menos de 5% de la enzima que se sintetiza. Esto concuerda con la idea de que las hidrolasas ácidas son transportadas desde el aparato de Golgi a los lisosomas sin necesidad de ser secretadas. En la actualidad se sabe que el marcador de reconocimiento permite que las enzimas lisosomales sean transportadas, gracias a receptores específicos, desde el aparato de Golgi a los endosomas. En pacientes con Mucolipidosis II, el marcador fosforalizado está ausente, por lo que las hidrolasas ácidas al no ser reconocidas por sus receptores son secretadas junto con proteínas que normalmente se encuentran en el suero.

En los últimos años se ha avanzado de forma importante para comprender los mecanismos moleculares de la biogénesis de los lisosomas. Excepto en raras excepciones, las enzimas lisosomales son glicoproteínas que contienen cadenas glicosídicas unidas a residuos de serina (*O*-glicosídicas) o de asparagina (*N*-glicosídicas). Como todas la proteínas secretorias, las enzimas lisosomales son sintetizadas en ribosomas adheridos a las membranas del retículo endoplásmico rugoso (figura 16-5). De forma cotraduccional, las cadenas nacientes de los péptidos al ir penetrando al lumen del retículo, pueden ser glicosiladas en residuos de asparagina que están asociados a un residuo de aminoácido y seguido por una serina o una treonina. Las proteínas sintetizadas, secretorias y lisosomales, son transportadas en vesículas al aparato de Golgi, en donde únicamente ciertos residuos terminales de manosa de las cadenas glicosídicas de alta manosa, presentes en las enzimas lisosomales, serán fosforiladas. Estos residuos de manosa-6-fosfato actuarán como marcadores específicos que permitirán que las proteínas lisosomales sean separadas de las proteínas secretorias y a la vez transportadas a los lisosomas. La incorporación de un fosfato en el C-6 de manosas terminales se lleva a cabo gracias a la acción de dos enzimas que están localizadas en la parte *cis* del aparato de Golgi. En un primer paso, una fosfotransferasa transfiere un residuo de *N*-acetilglucosamina-1-fosfato presente en una molécula de UDP-*N*-acetilglucosamina al grupo hidroxilo C-6 de una de las manosas terminales de un cadena de alta manosa. En una segunda reacción, una fosfodiesterasa remueve el grupo *N*-acetilglucosamina, quedando el fosfato unido al C-6 de las manosas. Se ha visto que las enzimas lisosomales a las cuales se le han removido los residuos glicosídicos actúan como inhibidores de la fosforilación de hidrolasas ácidas glicosiladas. Esto sugiere que la fosfotransferasa, además de reconocer los residuos de manosa, también reconoce alguna región peptídica que es común en las más de 50 enzimas lisosomales que se han encontrado. Tan pronto la fosfodiesterasa ha removido el grupo de *N*-acetilglucosamina, las enzimas lisosomales que contienen el marcador de manosa-6-fosfato son reconocidas por dos tipos de receptores membranales, uno en que la unión depende de cationes (CD-M6PR) y otro independiente de cationes (CI-M6PR). De esta forma, las hidrolasas

Las enzimas lisosomales son glicoproteínas que contienen cadenas glicosídicas unidas a residuos de serina (*O*-glicosídicas) o de asparagina (*N*-glicosídicas).

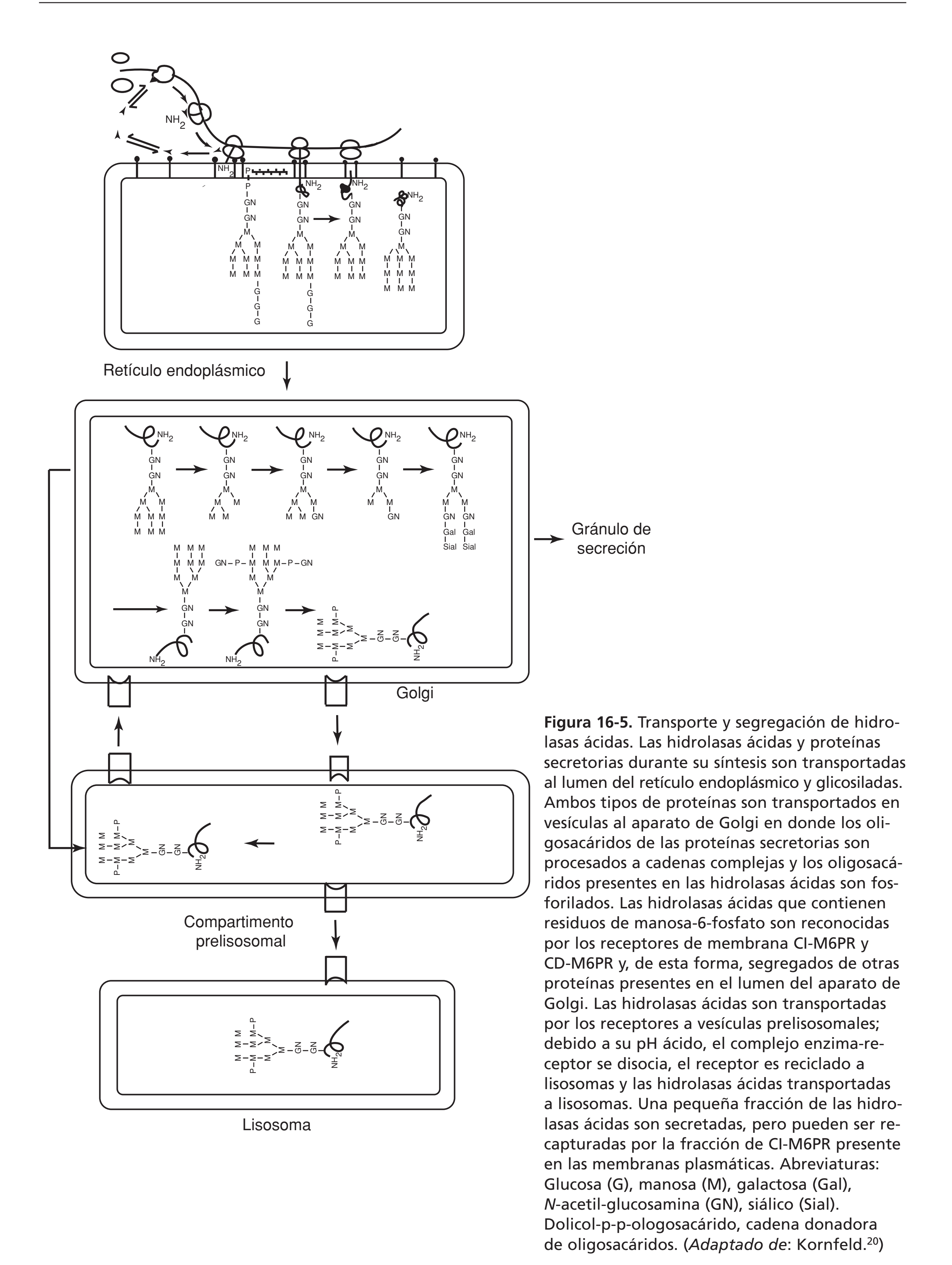


Figura 16-5. Transporte y segregación de hidrolasas ácidas. Las hidrolasas ácidas y proteínas secretorias durante su síntesis son transportadas al lumen del retículo endoplásmico y glicosiladas. Ambos tipos de proteínas son transportados en vesículas al aparato de Golgi en donde los oligosacáridos de las proteínas secretorias son procesados a cadenas complejas y los oligosacáridos presentes en las hidrolasas ácidas son fosforilados. Las hidrolasas ácidas que contienen residuos de manosa-6-fosfato son reconocidas por los receptores de membrana CI-M6PR y CD-M6PR y, de esta forma, segregados de otras proteínas presentes en el lumen del aparato de Golgi. Las hidrolasas ácidas son transportadas por los receptores a vesículas prelisosomales; debido a su pH ácido, el complejo enzima-receptor se disocia, el receptor es reciclado a lisosomas y las hidrolasas ácidas transportadas a lisosomas. Una pequeña fracción de las hidrolasas ácidas son secretadas, pero pueden ser recapturadas por la fracción de CI-M6PR presente en las membranas plasmáticas. Abreviaturas: Glucosa (G), manosa (M), galactosa (Gal), *N*-acetil-glucosamina (GN), siálico (Sial). Dolicol-p-p-ologosacárido, cadena donadora de oligosacáridos. (*Adaptado de*: Kornfeld.[20])

ácidas son separadas de otras proteínas solubles que están presentes en el lumen de los sáculos de Golgi. Seguidamente los complejos receptor-enzima salen del aparato de Golgi en vesículas cubiertas, las cuales se fusionan con los endosomas tardíos. En este compartimento, debido a su pH moderadamente ácido, el complejo receptor-enzima se disocia. Las hidrolasas ácidas liberadas son transportadas a los lisosomas en donde pierden inmediatamente el grupo fosfato. Los receptores son reciclados nuevamente al aparato de Golgi con el fin de seguir acarreando más hidrolasas ácidas. Una fracción de la población de receptores (10%) recicla desde los endosomas a las membranas plasmáticas, en donde únicamente los receptores independientes de cationes (CI-M6PR) tienen la capacidad de recapturar y llevar a los endosomas a aquellas enzimas lisosomales que han sido secretadas y contienen el marcador de manosa-6-fosfato.

No obstante los avances alcanzados, aún quedan un sinnúmero de cuestiones por resolver. Por ejemplo, no está claro por qué en un misma célula hay dos tipos de receptores con capacidad de reconocer al residuo de manosa-6-fosfato y por qué el receptor que requiere de cationes para reconocer a las hidrolasas ácidas, no obstante que se encuentra en la membrana plasmática, no tiene la capacidad de recapturar a las hidrolasas que han sido secretadas. Por otra parte, a pesar de que en fibroblastos en cultivo se ha comprobado que el marcador de manosa-6-fosfato es necesario para la compartimentación de prácticamente todas las enzimas lisosomales, hay evidencias de que deben existir mecanismos alternos para su transporte intracelular en otros tipos celulares. Así, en hepatocitos, células de Kupffer y leucocitos provenientes de pacientes con la enfermedad de células “I”, existen niveles prácticamente normales para una serie de enzimas lisosomales, no obstante la deficiencia para la fosfotransferasa. Recientemente se ha encontrado un nuevo receptor de 78 kDa para el transporte intracelular de hidrolasas ácidas; aunque aún se desconoce la naturaleza química de este marcador, se ha podido comprobar que una enzima lisosomal puede poseer el marcador de manosa-6-fosfato y el nuevo. Este hallazgo abre nuevas posibilidades para conocer los mecanismos por los cuales una molécula es transportada desde su sitio de síntesis hasta su destino final.

Proteínas integrales de la membrana lisosomal

Varias líneas de evidencias indican que el transporte de las proteínas integrales de la membrana de los lisosomas (LIMP) no es mediada (como las hidrolasas ácidas que son solubles) por un oligosacárido que contiene el marcador de reconocimiento para manosa-6-fosfato. Primero, el transporte y niveles de las LIMP es similar en fibroblastos de células “I” y en fibroblastos normales. Segundo, no se ha detectado fosforilación en las cadenas glicosídicas de estas glicoproteínas. Por último, si el proceso de glicosilación de proteínas se inhibe con tunicamicina, ninguna proteína puede adquirir el marcador de reconocimiento fosforilado; en estas circunstancias, las LIMP siguen siendo transportadas en forma normal a lisosomas. La ruta de transporte de las LIMP es similar a la comunicada para las proteínas solubles de lisosomas. Es decir, son sinteti-

zadas en el retículo endoplásmico y de ahí son transportadas a las membranas del aparato de Golgi. A partir de este punto, hay una serie de controversias, ya que hay estudios que indican que son transportadas a los endosomas y de ahí a los lisosomas. Hay algunos reportes que indican que una fracción de algunas proteínas de membrana lisosomal (LAMP) son transportadas primero a la membrana celular antes de ser transportadas a los lisosomas.

Con el fin de conocer si algún dominio de las LIMP posee elementos informativos responsables para el transporte y destino final de este tipo de proteínas de membrana, se han utilizados algunas de las herramientas que nos ofrece la biología molecular, como es clonar los genes que las codifican, alterar su composición y transfectar células con el fin de expresar la nueva proteína y examinar su destino final. De esta forma se han obtenido proteínas membranales quiméricas de la membrana plasmática que contienen segmentos de las LIMP y se ha observado que las que incluyen uno de los segmentos peptídicos de las LIMP que se encuentran en el lado citosólico de estas proteínas integrales de membrana, son transportadas a los lisosomas. Seguidamente, por medio de mutagénesis dirigida, se ha podido alterar de diferentes formas la composición de aminoácidos de las regiones citosólicas de las proteínas integrales de las membranas lisosomales. Este tipo de estudios realizado con distintas proteínas de membrana lisosomal de diferentes especies ha permitido concluir que, en los segmentos de las colas citosólicas, amino- o carboxiterminal, reside un señal que es indispensable para el transporte y destino final de este tipo de proteínas membranales. Se han podido detectar dos secuencias de aminoácidos específicos, localizadas en diferentes LIMP, que determinan una compartimentación correcta de las proteínas de la membrana lisosomal, una dada por la secuencia Gly-Tyr y otra dada por Leu(lleu)-Lleu (tabla 16-2). Cualquier sustitución en alguno de estos aminoácidos altera el destino final de estas proteínas, bien no permitiéndolas salir del retículo, transportándolas a la región del aparato de Golgi o bien a la membrana plasmática, pero no a los lisosomas. Se deben tomar con cierta cautela los experimentos de transfección, ya que la proteína que se expresa lo hace en cantidades mayores a las que normalmente se sintetizan en condiciones habituales, pudiéndose producir condiciones no fisiológicas. No obstante, este tipo de experimentos, complementados con experimentos de pulso y caza y microscopia (para los que se han utilizado anticuerpos fluorescinados, específicos para las LIMP) han permitido detectar que las proteínas de la membrana lisosomal son sintetizadas en la membrana del retículo endoplásmico y, como proteínas integrales, son transportadas a la región *trans* del aparato de Golgi, de aquí en pequeñas vesículas a los endosomas y por último a los lisosomas. En condiciones normales, una pequeña cantidad de algunos tipos de LIMP (que contienen la secuencia Gly-Tyr) es transportada primero a la membrana plasmática, de donde son endocitados y transportados a endosomas y de allí a lisosomas. En células transfectadas con el gen de alguna de estas proteínas, se incrementa en forma importante la fracción que recicla a través de la membrana plasmática antes de llegar a lisosomas, lo que sugiere que quizás se satura la ruta directa de transporte a lisosomas. Por último, se ha encontrado que el número de moléculas de las LIMP presente en las membranas de

lisosomas es diferente, así como también lo es la velocidad de transportación desde el retículo a los lisosomas y la vida media de cada una de ellas. Estas observaciones sugieren que debe haber algún tipo de regulación en la síntesis y degradación de las LIMP de forma que permita mantener la identidad de los lisosomas.

Tabla 16-2.

Secuencias de reconocimiento para la retención, segregación o transporte intracelular de proteínas	
1. Señales para la retención de proteínas transmembranales en retículo endoplásmico.	
E3/E19 Subunidades de adenovirus	…**K**-**K**-X-X-…..
UDP Glucuronil-transferasa	…**K**-X-**K**-X
2. Señales para la retención de proteínas solubles en retículo endoplásmico.	
PDI, rata	….QKAV**KDEL**
humana	….QKAV**KDEL**
BIP, humana	….DTSE**KDEL**
tomate	…EDDS**HDEL**
S.cerevisiae	…DYFE**HDEL**
Estearasa de intestino	...HSSN**KDEL**
Calregulina	...RRQA**KDEL**
3. Señales para la segregación en aparato de Golgi de enzimas lisosomales.	
50 Hidrolasas ácidas	Residuo de manosa-6-fosfato en cadenas glicosídicas de alta manosa
4. Señales para el transporte a lisosomas de proteínas integrales de la membrana del lisosoma.	
LAMP 1	….SHA**GY**QTI…
LAMP 2	….HHA**GY**EQF..
LAMP 3	… IRS**GY**EVM
Fosfatasa ácida, humana	…..EPP**GY**RHV
LIMP II	….DERAP**LI**RT
5. Señales para la endocitosis de receptores.	
CD-M6PR, humana	….FENTL**Y**…
bovina	….**Y**RGV…
CI-M6PR, bovina	YK**Y**SKV…
LDLR	FDNPV**Y**…
Transferrina	…..**Y**TRF..
Receptor poli-IgG de conejo	…..**Y**SAF…



Transporte vesicular de macromoléculas

La existencia de compartimentos dentro de la célula permite incrementar la superficie de un determinado organelo y la formación de regiones especializadas funcionalmente aisladas del resto de la célula. Asimismo, las membranas celulares proveen una barrera que permite el paso controlado de moléculas y mecanismos para la transmisión de señales desde fuera hacia adentro de un compartimento de la célula.

La bicapa lipídica presente en todas las membranas celulares es una barrera altamente impermeable para la mayoría de las moléculas hidrofílicas, que previene el libre paso de compuestos solubles a través de estas barreras (Rudnick, 1986; Sandoval y col., 1994; Sandoval y Bakke, 1994; Smythe y Warren,

1991; Sorkin y Waters, 1993). Por lo mismo, la membrana de cada organelo debe poseer mecanismos que permitan la importación o exportación de metabolitos específicos, con lo cual un compartimento se interrelaciona con el resto de la célula. Para resolver este dilema, a lo largo del proceso evolutivo se han desarrollado mecanismos que permiten la importación o exportación de diferentes tipos de moléculas. Proteínas específicas localizadas en las membranas celulares pueden mediar el transporte de moléculas polares pequeñas a través de las membranas, pero no el de macromoléculas, tales como proteínas, polinucleótidos o polisacáridos y menos aún microorganismos. Este problema ha sido resuelto de diferentes formas:

1. El tráfico de macromoléculas entre el citosol y el núcleo está controlado por poros localizados en la superficie del núcleo que actúan como compuertas selectivas que transportan en forma activa proteínas específicas y RNA.
2. Se han descrito proteínas membranales que se comportan como translocadores que dirigen el transporte de proteínas específicas a través de las membranas desde el citosol al interior de organelos específicos. Así, mientras que el cruce de proteínas a través de las membranas del retículo endoplásmico es un suceso cotraduccional que se lleva a cabo durante la síntesis de proteínas, la entrada de proteínas a peroxosimas, cloroplastos y mitocondrias es un hecho postraduccional, por lo que las proteínas, una vez sintetizadas, deben desenrollarse con el fin de poder pasar a través de la membrana al interior del organelo.
3. Por último, el transporte vesicular, que se trata a continuación, permite el transporte de macromoléculas desde un compartimento a otro. Es importante señalar que tanto las vesículas que transportan proteínas de un organelo a otro, como las vesículas exocíticas y las endocíticas, no se fusionan con cualquier organelo o vesícula, lo cual permite una transferencia ordenada de macromoléculas entre el exterior y el interior de la célula, y entre un compartimento y otro.

Las vesículas se forman por gemación a partir de las membranas del retículo endoplásmico, aparato de Golgi, endosomas o la membrana plasmática; durante el proceso de formación, el interior de la gema se llena con macromoléculas que se encuentran en el lumen del organelo. Una vez que las paredes de la gema se fusionan, la vesícula formada transporta su cargamento a un compartimento destinatario (blanco), en donde se descarga su contenido. En la figura se muestran tres formas que la célula posee para importar o exportar productos. En el proceso de endocitosis, la membrana plasmática se invagina hacia el citoplasma capturando líquido extracelular antes de formar la vesícula endocítica. En el proceso de exocitosis, una vesícula intracelular se fusiona con la cara citoplásmica de la membrana plasmática; de esta manera, la membrana de la vesícula forma parte de la membrana plasmática. Los dominios de las proteínas que antes estaban en el lumen de las vesículas quedarán en el exterior de la célula y el contenido soluble de la vesículas será expulsado al exterior. Por último, puede haber

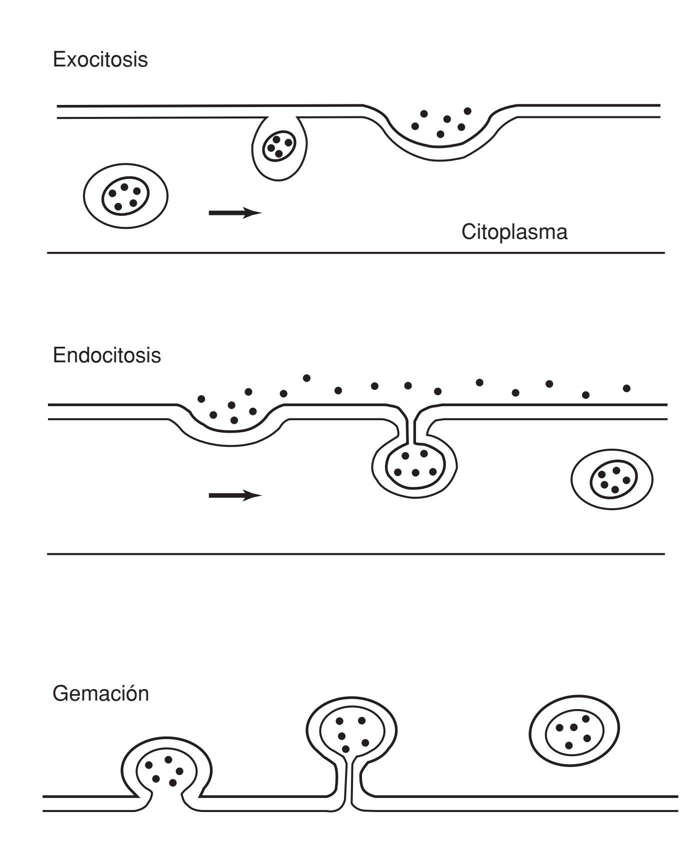


Figura 16-6. Mecanismos para el transporte intracelular de macromoléculas: representación esquemática de la formación de vesículas y su fusión a membranas en procesos de exocitosis, endocitosis y evaginación. Se debe hacer notar la equivalencia topológica de las membranas en cada uno de los procesos. En la exocitosis hay adherencia y fusión entre las caras citosólicas de las membranas; en la endocitosis es entre las dos caras no citosólicas de las membranas. En el proceso de evaginación dentro de la vesícula queda atrapado el citoplasma; en los otros dos procesos medio extracelular o el contenido luminal de un compartimento.

un proceso de evaginación de la membrana plasmática en el que se forma una vesícula extracelular. Este proceso es típico en la formación de virus que contienen lípidos en su cápside; en algunos parásitos, como los tripanosomas, la formación de estas vesículas se utiliza como mecanismo de escape, ya que les permite perder antígenos que son reconocidos por anticuerpos del huésped (figura 16-6).

La actividad endocítica ha sido dividida en dos categorías: fagocitosis (o comer) y pinocitosis (o beber).

Mecanismos para la entrada de compuestos a la célula

La actividad endocítica ha sido dividida en dos categorías: fagocitosis (o comer) y pinocitosis (o beber). La mayoría de los investigadores usa el término fagocitosis para describir la endocitosis de partículas grandes que se pueden visualizar con el microscopio de luz. La endocitosis ocurre por una aposición de un segmento de la membrana a la superficie de la partícula y en el que prácticamente se excluye todo el fluido que rodea a la partícula. El término pinocitosis es usado para describir la endocitosis vesicular de pequeñas partículas (lipoproteínas, coloides, complejos antígeno-anticuerpo, etc.), macromoléculas solubles (proteínas), moléculas solubles de bajo peso molecular y fluidos. Algunos números pueden ilustrar las diferencias entre fagocitosis y endocitosis. Dependiendo de la naturaleza, tamaño y digestibi-

lidad de la partícula, se internalizan grandes cantidades de membrana plasmática durante la fagocitosis. El tamaño de una vesícula fagocítica puede variar entre 1 y 10 µm; la de una vesícula endocítica, entre 0.1 y 1 µm. Dependiendo de su tamaño, la vesícula fagocítica puede involucrar hasta 40% de la membrana plasmática de la célula. El tiempo de ingestión de una partícula por fagocitosis es menos de un minuto. Aunque las vesículas pinocíticas son más pequeñas en tamaño, en macrófagos de peritoneo se ha podido cuantificar que en una hora se pueden formar hasta 7,500 vesículas que representan alrededor de 100 μm^3, es decir 26% del volumen de la célula o 186% de su superficie. No obstante la superficie de membrana plasmática que se retira durante el proceso de endocitosis, no varía ni la superficie ni el volumen celular. La célula posee varios mecanismos para regular su superficie celular. Por una parte, el aparato de Golgi es un reservorio de componentes de la membrana plasmática que tiene la capacidad de regular la cantidad de vesículas exocíticas formadas, dependiendo de la cantidad de vesículas endocíticas, o aumentar la endocitosis cuando se ha incrementado la exocitosis. Por otra parte, los componentes de membrana que están involucrados en las vesículas endocíticas o fagocíticas retornan a la membrana en forma de vesículas membranales para poder ser reutilizados.

Fagocitosis

Para que una partícula sea fagocitada, primero debe ser reconocida por receptores específicos presentes en la superficie del macrófago. Los receptores involucrados en la fagocitosis incluyen receptores que reconocen en la superficie de la partícula residuos de manosa y/o *N*-acetilglucosamina presentes en glicoproteínas, receptores que reconocen el dominio Fc de las inmunoglobulinas y receptor para el componente CR3 del complemento. Estos receptores son independientes, pero pueden actuar sinergéticamente en el proceso de fagocitosis.

> Para que una partícula sea fagocitada, primero debe ser reconocida por receptores específicos presentes en la superficie del macrófago.

La unión de la partícula que contiene los residuos glicosídicos o que está cubierta por anticuerpos induce que el macrófago extienda pseudópodos, los cuales engloban la partícula y se fusionan para formar una vacuola fagocítica. El proceso de extensión de pseudópodos requiere de:

a) Una reorganización del entramado de microfilamentos (actina) que se encuentran en la región del citoplasma cercano a la membrana. La adición de citocalasina D, que afecta a la reorganización de los microfilamentos, inhibe el proceso fagocítico.
b) Una temperatura por enzima de 20 °C.
c) Energía dependiente de ATP.
d) Que la partícula susceptible de ser fagocitada esté cubierta por ligandos que puedan ser reconocidos por uno de los receptores del macrófago. La distribución de los ligandos en la superficie de la partícula que va a ser fagocitada debe ser homogénea, ya que se ha visto experimentalmente que, si estos ligandos están confinados en un polo de la célula, el pseudópodo no se puede elongar (figura 16-7).

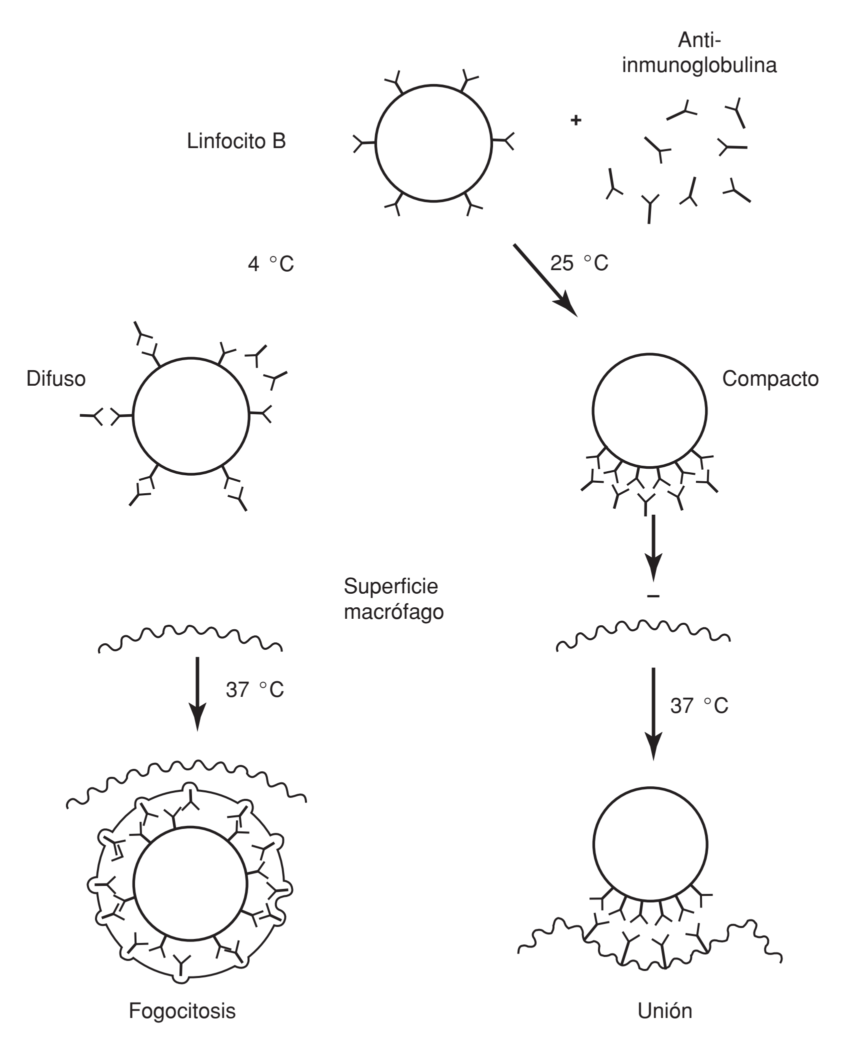


Figura 16-7. Representación esquemática del proceso de fagocitosis mediante el modelo de *zíper*. Este modelo predice que una partícula que contiene ligandos distribuidos uniformemente puede ser fagocitada; por el contrario, si los ligandos están concentrados en una zona de su superficie, la partícula puede ser reconocida por el macrófago pero no endocitada. En la figura se muestra que, cuando los linfocitos son incubados con anti-inmunoglobulinas, las IgG de 25 a 37 °C causan la redistribución (concentración) de inmunoglobulinas y antiinmunoglobulinas en un polo de la célula. La redistribución de inmunoglobulinas no se lleva a cabo a 4 °C y por ende la fagocitosis. (Adaptado de Taylor y cols., 1971).

Una vez que se forma la vesícula fagocítica, las vesículas que contienen las hidrolasas ácidas se fusionan con el fagosoma y a partir del fagosoma se forman vesículas que incluyen los elementos de membrana que son regresados (reciclados) a la membrana plasmática. De esta forma, el fagosoma se convierte en fagolisosoma, es decir, en una vesícula que contiene en su membrana marcadores de membrana típicos del lisosoma, que tiene un pH ácido y un contenido de hidrolasas ácidas capaz de digerir la partícula que ha sido ingerida. En los últimos años, el estudio en macrófagos infectados con parásitos intracelulares ha permitido utilizar nuevos enfoques para

comprender los mecanismos para la formación y función del fagolisosoma. Por ejemplo, se ha visto que cuando *Mycobacterium tuberculosis* es fagocitado por un macrófago, el fagolisosoma que lo contiene posee todos los componentes membranales de un fagolisosoma, con excepción de la bomba responsable de introducir protones y mantener el pH ácido de la vesícula; de esta forma, el bacilo puede sobrevivir en un medio neutro, en el que las hidrolasas ácidas tienen un mínimo de actividad. Aún se desconoce el mecanismo que previene la incorporación selectiva de la bomba de protones. El caso contrario es el de *Leishmania* que vive en medios ácidos y se escapa de la acción de las hidrolasas ácidas, destruyendo al receptor de manosa-6-fosfato que transporta las hidrolasas al fagolisosoma.

Pinocitosis

La pinocitosis se puede llevar a cabo en dos formas diferentes: pinocitosis (endocitosis) fluida y adsortiva. Estos términos distinguen la forma en que las sustancias son capturadas por la célula, bien solubles en el fluido o adsorbidas a receptores específicos presentes en la membrana. En la pinocitosis fluida, la velocidad de entrada de los solutos a la célula es directamente proporcional a su concentración en los fluidos extracelulares, pero también a la capacidad de cada célula para formar vesículas pinocíticas. En promedio, se considera que las células pueden captar en una hora 0.1 ml de líquido por miligramo de proteína celular. En contraste, la velocidad de entrada de una molécula por endocitosis adsortiva está dada por su concentración extracelular, por el número, especificidad, afinidad y función de los sitios de unión (receptores) localizados en la superficie de la membrana. En términos generales, la endocitosis adsortiva se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten. En igualdad de circunstancias, es decir, misma concentración de una molécula que será endocitada por pinocitosis adsortiva y otra por pinocitosis fluida, la primera lo hará a una velocidad 100 a 1,000 veces más rápida que la segunda. La endocitosis adsortiva se caracteriza, además, por ser un mecanismo específico que permite concentrar en contra de gradiente una molécula dada sin tener que ingerir grandes cantidades de líquido extracelular.

> La pinocitosis se puede llevar a cabo en dos formas diferentes: pinocitosis (endocitosis) fluida y adsortiva.



Maquinaria involucrada en el transporte vesicular

Como parte del metabolismo del colesterol, las células de mamífero poseen un tipo de receptor específico para capturar y llevar a los lisosomas lipoproteínas de baja densidad (LDL). Se han descrito casos de hipercolesterolemia familiar, en la que las células de los pacientes, no obstante poseen el receptor que identifica las moléculas de LDL, no tienen la capacidad de endocitar este tipo de lipoproteínas y en consecuencia degradarlas. La caracterización de esta mutación se debe a una deleción parcial de la cola citosólica de esta proteína integral de la membrana plasmática. Estudios inmunocitoquímicos han mostrado que en estos pacientes el receptor se

encuentra disperso en la superficie celular y ha perdido la capacidad de agregarse con otros en las vesículas cubiertas. Estas observaciones abrieron el camino para conocer que los dominios citosólicos de los receptores desempeñan un papel determinante tanto para la agrupación de receptores como para su endocitosis. Estudios de la secuencia de varios receptores que pueden ser endocitados, como alteración de sus secuencias por medio de mutagénesis dirigida y expresión en células, han mostrado la existencia de una señal para la endocitosis de proteínas. Esta señal (YXXZ/NXXY) requiere de una tirosina y un aminoácido hidrofóbico (Z) que puede ser leucina (L), isoleucina (I), valina (V), metionina (M), cisteína (C) o alanina (A); o bien asparagina (N) (tabla 16-2) (Steinman y cols., 1983; Stevens y Forgee, 1997; Storrie y Besjardis, 2000; Sztul y cols., 1992; Taylor y cols., 1971; Trowbridge, 1991).

Pinocitosis a partir de oquedades cubiertas

Con el microscopio electrónico se pueden identificar las áreas de la membrana plasmática en las que se llevará a cabo el proceso de endocitosis adsortiva. En la membrana plasmática se pueden observar invaginaciones en las que a primera vista la membrana aparece engrosada; esto se debe a que en su superficie citosólica hay adsorbidas una serie de proteínas que dan un aspecto musgoso, por lo que se conocen como criptas (oquedades) cubiertas (figura 16-8). Esta estructura es transitoria, ya que tan pronto se forma la invaginación sigue creciendo hasta que sus bordes, a la altura de la superficie celular, se comprimen para formar una vesícula citosólica (vesícula cubierta), cuya vida media es corta, ya que la vesícula pierde la cubierta

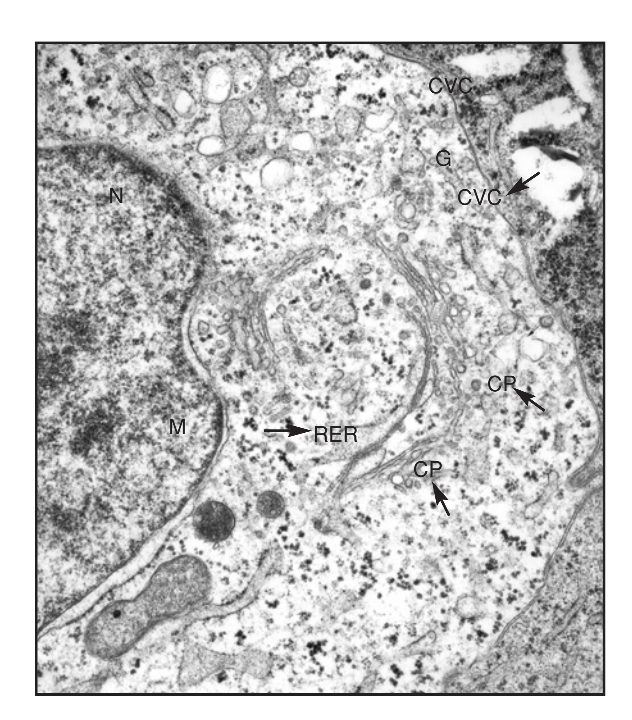


Figura 16-8. Micrografía electrónica de célula de Sertoli de embrión de ratón en la que se observan: oquedades cubiertas y vesículas cubiertas de clatrina en proceso de formación, a partir de la membrana plasmática y del aparato de Golgi. Abreviaturas: N, núcleo; G, Golgi; M, mitocondria; RER, retículo endoplásmico rugoso (se observan ribosomas unidos a la membrana); CVC, vesículas cubiertas de clatrina; CP, oquedades cubiertas. (Micrografía proporcionada por el Dr. H. Merchant.)

antes de fusionarse con los endosomas. Las criptas cubiertas ocupan aproximadamente 2% de la superficie total de la membrana plasmática. Su vida media es corta; en fibroblastos en cultivo, se ha estimado que aproximadamente se forman 2,500 cavidades cubiertas por minuto por célula. En las criptas cubiertas se acumulan receptores específicos que reconocen hormonas, factores de crecimiento, proteínas acarreadoras y otras proteínas que serán endocitadas por medio de un proceso de pinocitosis adsortiva. Se han descrito más de 25 receptores que participan en la endocitosis adsortiva de diferentes tipos de moléculas; aparentemente todos ellos son endocitados a través de las vesículas cubiertas. Muchos de estos receptores se concentran en dichas vesículas, otros se encuentran normalmente dispersos en la membrana plasmática; sin embargo, en cuanto el sustrato que reconocen se une a ellos, el complejo receptor-ligando emigra a las vesículas cubiertas, lo que sugiere que tal vez sufren un cambio conformacional al momento en que su ligando se une a ellos. Las vesículas cubiertas quizás sirven de filtros que acumulan en ellos ciertas proteínas plasmáticas (receptores) y excluyen a otras. Se ha calculado que en una vesícula cubierta puede haber hasta 1,000 receptores, pudiendo coexistir en una misma cavidad diferentes tipos de receptores. No obstante la coexistencia de varios tipos de receptores en una vesícula, la endocitosis de un complejo no afecta a la de los demás, ni tampoco la presencia de dos o más ligandos altera la velocidad de endocitosis de cada uno de ellos. En conclusión, la formación de las vesículas cubiertas tiene por lo menos dos funciones: la de capturar y agrupar receptores específicos y los ligandos que a ellos se unen y generar un andamiaje que sirve además de fuerza motriz para que la membrana se invagine hasta lograr que se colapsen sus paredes y se forme una vesícula.

Las vesículas cubiertas de clatrina no deben confundirse con las vesículas cubiertas que se encuentran en el aparato de Golgi y que sirven para transportar localmente macromoléculas (ver capítulo Aparato de Golgi). En la tabla 16-3 se comparan los pesos moleculares de los principales componentes de ambos tipos de cubiertas (se debe resaltar la semejanza entre los pesos de cada familia de proteínas). Estas coincidencias sugieren que el tipo de red que se forma en un tipo y otro de vesículas puede ser semejante.

Pinocitosis en vesículas no cubiertas por clatrina

Principalmente este tipo de vesículas contiene aquellos solutos que son endocitados por un proceso de pinocitosis fluida. En esencia, es un proceso no específico, en el que no hay una inclusión o exclusión activa de alguna molécula. La cantidad de material endocitado es proporcional al de su concentración en el líquido extracelular. Se ha observado que en condiciones en que se inhibe la endocitosis adsortiva (endocitosis en vesículas cubiertas), como es la depleción de potasio, acidificación del citosol, o choque hipertónico, no se afecta la pinocitosis fluida. La formación de vesículas cubiertas es particularmente activa en las células endoteliales que forman la pared de

Tabla 16-3. Comparación de proteínas de la cubierta en dos tipos de vesículas cubiertas.

Vesículas cubiertas de clatrina		Vesículas cubiertas con COPs	
Clatrina			
cadenas pesadas	(180 K)		
cadenas ligeras	(30 a 40 K)		
Adaptinas		COP	
β o β'-adaptina	(105 K)	α-COP	(160 K)
α o γ-adaptina	(92 a 108 K)	β-COP	(110 K)
proteína - 50 K	(47 a 50 K)	γ-COP	(98 K)
proteína-20 K	(17 a 20 K)	δ-COP	(61 K)

Las vesículas cubiertas con clatrina se forman a partir de la membrana plasmática o del *trans* del aparato de Golgi; las vesículas cubiertas con COP (cubierta de proteína) transportan proteínas de uno a otro de los subcompartimentos del aparato de Golgi. Se puede ver que hay ciertas similaridades entre los pesos moleculares de clatrina y adaptinas con los de las COP. En estas vesículas se han encontrado además proteínas que tienen un tamaño similar al de las cadenas ligeras de clatrina y de la proteína 20 K. Hay diferencias importantes entre un tipo y otro de vesículas; por ejemplo, el contenido de la α-COP es mucho más reducido que el de clatrina.

los vasos sanguíneos, ya que deben transportar solutos del torrente circulatorio al espacio extracelular.

Clatrina

Se han identificado varios tipos de proteínas en la cubierta de las criptas y de las vesículas cubiertas.

Se han identificado varios tipos de proteínas en la cubierta de las criptas y de las vesículas cubiertas. El mayor componente es la clatrina, el cual a su vez es un complejo de proteínas altamente conservado durante la evolución. Consta de dos tipos de péptidos que se unen para formar una especie de hélice de tres aspas (triskelion). Cada aspa tiene forma de ángulo y está formada por una cadena pesada a la cual se une una cadena ligera. Los triskeliones se pueden polimerizar formando una redecilla; si la polimerización es sobre una superficie plana, se constituye en base de hexágonos en los que cada lado tiene elementos de cuatro triskeliones (figura 16-9). En el momento que se empieza a formar la invaginación en la membrana plasmática, la red sufre una transformación, ya que se pueden ver pentágonos y hexágonos; la red crece en tamaño y va colapsando la cripta a manera de un matraz de bola. En este momento, en el cuello de la invaginación se polimerizan moléculas de dinamina, las cuales actúan en presencia de GTP, estrangulando el cuello hasta que se fusiona la capa lipídica y se forma la vesícula. De esta forma la clatrina proporciona un andamiaje y una fuerza motriz en la formación de las vesículas endocíticas.

Una vez que se forma la vesícula, casi inmediatamente se pierde la capa de clatrina; este proceso se lleva gracias a una ATPasa. Se piensa que debe de haber un proceso regulador que previene que la ATPasa actúe durante el proceso de ensamblaje de la clatrina. Un candidato puede ser el calcio, el cual se sabe se une a las cadenas ligeras de clatrina. Este catión es bombeado afuera de las vesículas tan pronto se forman; el eflujo de calcio puede proporcionar una concentración elevada en torno de la capa citosólica de la vesícula.

Cadena ligera
Cadena pesada
Trieskelion de clatrina
Malla hexagonal
de triesqueletos de clatrina

Figura 16-9. Estructura de los triskelion de clatrina y la malla hexagonal que se forma al ensamblarse para formar las oquedades cubiertas. El triskelion está formado por tres cadenas pesadas de clatrina, a cada una de las cuales se une una cadena ligera de clatrina. Las cadenas pesadas se unen por el carboxiterminal, el conjunto ha sido observado con el microscopio electrónico y tiene la apariencia de una hélice. Los triskeliones pueden unirse entre sí para formar una malla hexagonal en la que cada lado tiene elementos de cuatro triskeliones. Esta malla, al formar la cubierta en las vesículas cubiertas, en realidad está constituida por hexágonos y pentágonos. (Adaptada de Pears y Robinson, 1990).

Adaptinas

La identificación de las secuencias que sirven como señales de internalización en los dominios citosólicos de las proteínas que se encuentran en las criptas cubiertas por clatrina, permitió identificar a otras proteínas conocidas como adaptinas, que funcionan como adaptadores de las colas citosólicas a las cadenas de clatrina. Los componentes de la cubierta de las vesículas pueden purificarse a partir de preparaciones de vesículas cubiertas utilizando altas concentraciones de sales, seguido por cromatografía. De esta manera se pueden obtener los triskeliones y dos tipos de adaptinas, HA1 (AP1) y HA2 (AP2). Cada uno de los adaptadores está compuesto por dos tipos de péptidos cuyo peso fluctúa entre 100 y 110 KDa (α y β en AP2, γ y β en AP1) y dos polipéptidos más pequeños (AP50 y AP17 en AP2 y AP47 y AP19 en AP1) (figura 16-10). Estudios inmunocitoquímicos que utilizan anticuerpos en contra de α o de γ muestran que el adaptador AP1 es un componente de las vesículas cubiertas que se generan a partir de la región *trans* del aparato de Golgi; la adaptina AP2 está presente en las criptas cubiertas y las vesículas que se generan a partir de ellas. Las adaptinas AP2 interactúan de manera específica con las señales endocíticas de los dominios citosólicos de las proteínas de la membrana plasmática que tienen capacidad de ser endocitados. Las adaptinas al ser reconocidas por las cadenas pesadas de la clatrina agrupan a los receptores; de esta forma, el complejo receptor, adaptina, clatrina forma las criptas cubiertas. La capacidad de los adaptadores para reconocer las señales de endocitosis ha sido mostrada por cromatografía de afinidad en la que el ligando inmovilizado serían las colas citosólicas de receptores específicos (figura 16-11). Este tipo de experimentos ha mostrado que las adaptinas AP2 solamente recono-

cen receptores cuya función es capturar y endocitar proteínas séricas (LDL, asialoglicoproteínas, etc.); en contraste, ambos tipos de adaptinas reconocen al receptor que transporta a las enzimas lisosomales (CI-M6PR). Como se indicó anteriormente, este receptor tiene una doble función: transporta enzimas lisosomales desde el aparato de Golgi a los endosomas, o bien recaptura enzimas lisosomales y las transporta a los endosomas. De hecho, la cola citosólica de este receptor posee en dominios diferentes la señal de endocitosis YXXZ que es reconocida por la adaptina AP2 y la señal LZ que es reconocida por la adaptina AP1.

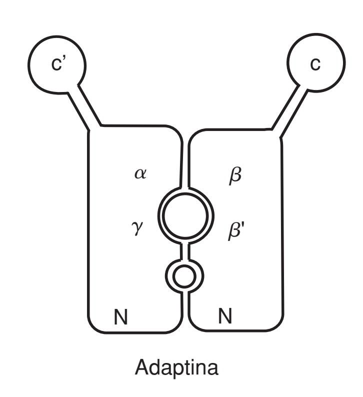


Figura 16-10. Representación esquemática de las adaptinas. Las adaptinas HA1 y HA2 han sido purificadas y observadas al microscopio electrónico. Ambas son tetrámeros formados por cadenas α o γ y β o β'; entre ambas cadenas pesadas se localizan dos tipos de proteínas más pequeñas que tienen un peso molecular de 50 a 47 KDa y de 20 a 17 KDa. El carboxiterminal de las cadenas pesadas tiene una forma de orejas lobuladas. Este dominio es el que reconoce las regiones citosólicas de los receptores (Adaptada de Pears y Robinson,1990).

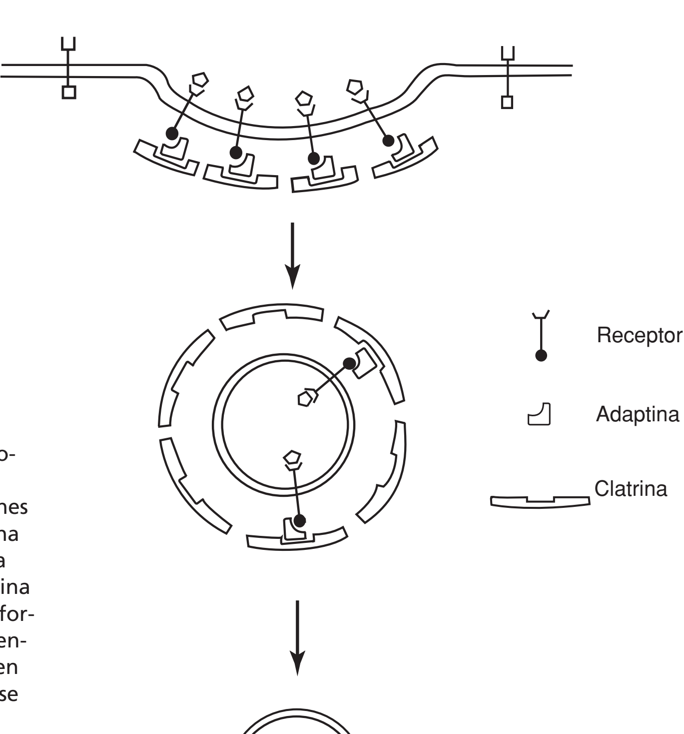
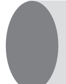


Figura 16-11. Formación de vesículas cubiertas de clatrina en la membrana plasmática. Las proteínas membranales que contienen una señal específica (señal para endocitosis) en las regiones localizadas en el lado citosólico de la membrana son reconocidas por adaptinas tipo AP2, que, a su vez, son reconocidas por la clatrina. La clatrina unida a la adaptina inicia su autoensamblado formando una retícula que favorece el agrupamiento de las proteínas membranales (receptores) en las oquedades cubiertas, a partir de las cuales se forman las vesículas cubiertas de clatrina. Una vez formada la vesícula endocítica se inicia un proceso para retirar las adaptinas y la clatrina de la superficie de la membrana. Tanto la formación de las vesículas como la pérdida de la cubierta de la vesícula requieren una serie de proteínas cuyo papel aún no es bien conocido.

Recientemente se ha reportado la existencia de otras dos adaptinas, la AP3 y la AP4. Aún no se conoce bien la función de ambas adaptinas. La AP3 está localizada en la parte *trans* del aparato de Golgi y en los endosomas y reconoce la cola citosólica de las proteínas que contienen Leu-Leu, pero no Gly-Tyr. Esto abre la posibilidad de que las adaptinas desempeñan un papel importante para determinar qué proteínas se deben localizar en cada una de las vesículas que se forman a partir de uno y otro organelo.



Rutas de transporte intracelular de vesículas endocíticas

Como se ha mencionado, el transporte vesicular ofrece un medio por el cual las macromoléculas son transportadas en todas las células de eucariontes de un compartimento subcelular a otro. El proceso en su conjunto ha sido analizado en una variedad de sistemas y puede ser dividido en varias etapas (Storrie y Desjardis, 2000; Sztul y cols., 1992; Taylor y cols., 1971; Trowbridge, 1991).

1. Las moléculas destinadas para transporte son separadas en la membrana donadora.
2. Las vesículas se forman por gemación de la membrana donadora en un proceso en que se requiere una serie de proteínas citosólicas. Las vesículas son transportadas posiblemente utilizando el citoesqueleto celular hasta su blanco.
3. Las vesículas pierden su cubierta.
4. Las vesículas se unen a la membrana aceptora y proteínas fusogenéticas se activan con el fin de iniciar un rearreglo de la bicapa lipídica.
5. La fusión de las membranas toma lugar y la membrana vesicular forma parte de la membrana aceptora.

De la membrana plasmática a los lisosomas

El término endosoma fue acuñado por Novikoff (1963) y lo empleó como sinónimo de fagosoma. En la actualidad, son perfectamente distinguibles ambos términos. Un endosoma es una estructura intracelular que intercambia componentes con otros endosomas, el complejo de Golgi y la membrana plasmática. Se pueden distinguir dos tipos de endosomas: los tempranos, o también denominados endosomas ligeros, y los endosomas tardíos o densos. En principio, se pensó que un endosoma temprano madura en uno tardío al ir adquiriendo marcadores específicos (figura 16-12). Hoy en día se piensa que ambos tipos de endosomas son dos entidades identificables interconectadas gracias a vesículas que transportan los contenidos de la una a la otra. De hecho, algunos autores, con el fin de enfatizar estas diferencias, llaman prelisosomas a los endosomas tardíos.

Un endosoma es una estructura intracelular que intercambia componentes con otros endosomas, el complejo de Golgi y la membrana plasmática.

Se pueden distinguir dos tipos de endosomas: los tempranos, o también denominados endosomas ligeros, y los endosomas tardíos o densos.

Los endosomas tempranos reciben membranas, ligandos y solutos mendiante el influjo constante de vesículas que han sido formadas por un

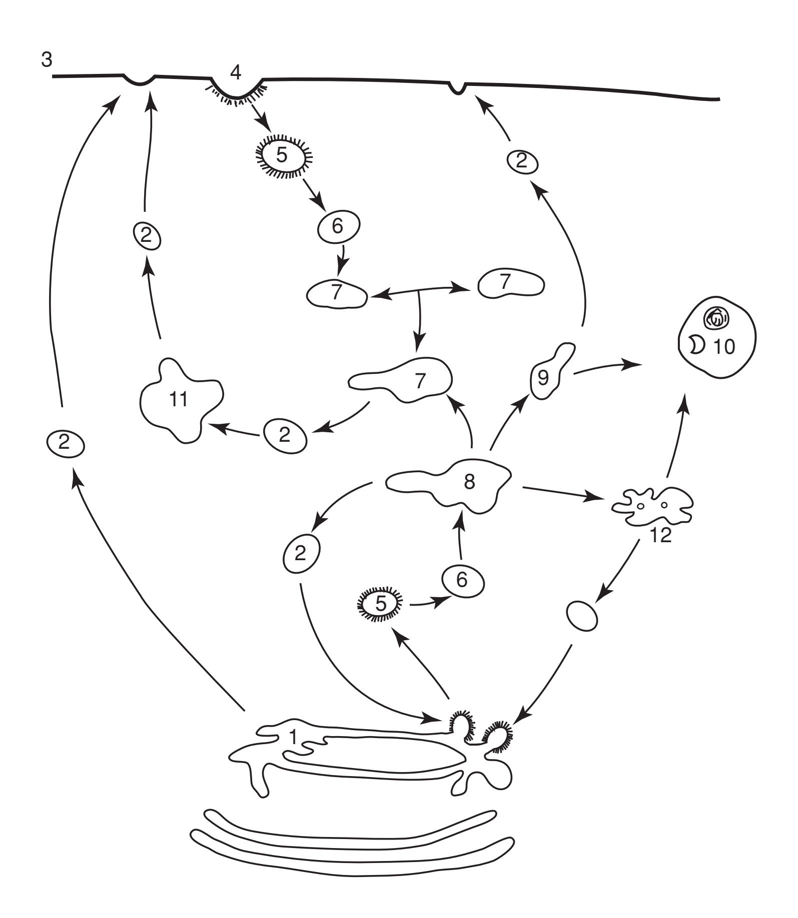


Figura 16-12. Vías de transporte de proteínas membranales a sistema lisosomal: 1) región *trans* del aparato de Golgi, 2) vesículas transportadoras, 3) membrana plasmática, 4) oquedades cubiertas, 5) vesículas cubiertas de clatrina, 6) vesícula descubierta, 7) endosoma temprano, 8) compartimento prelisosomal o endosoma maduro (tardío), 9) lisosomas tempranos, 10) lisosomas secundarios, 11) compartimento para reciclamiento, 12) compartimento de reintegración a trans. Las vesículas endocíticas se pueden fusionar entre sí, lo mismo ocurre con las vesículas lisosomales. (*Adaptada de* Sandoval y cols., 1994)

proceso de endocitosis. La mayoría de los componentes del endosoma temprano regresa a la membrana plasmática mediante vesículas que se forman en este compartimento. El pH moderadamente ácido de este compartimento (pH 6.2) permite que muchos ligandos se disocien de sus receptores, de manera que éstos pueden regresar a la membrana plasmática por un proceso que se conoce como reciclado de membranas. Los ligandos, así como los solutos endocitados, son transferidos a los endosomas tempranos mediante vesículas. Las vesículas de los ligandos llegan a este compartimento 5 min después de ser endocitadas. Los endosomas tempranos están localizadas primeramente en áreas periféricas de la célula. Su morfología es distinguible, tienen una morfología tubulovesicular con grandes vesículas con extensiones tubulares.

Los endosomas tardíos contienen hidrolasas ácidas del receptor de manosa-6-fosfato.

Los endosomas tardíos contienen hidrolasas ácidas del receptor de manosa-6-fosfato, que como ya mencionamos está involucrado en el

transporte de enzimas lisosomales sintetizadas *de novo* desde *trans*-Golgi hasta los endosomas. Gracias a que tiene un pH 5.5 a 6, que es intermedio entre lisosomas y endosomas tempranos, se puede disociar el complejo receptor-hidrolasa ácida. Si tomamos en cuenta que a este compartimento son transportados los solutos 15 a 20 min después de ser endocitados y que provienen de endosomas tempranos, tendremos una vesícula en la que coexisten hidrolasas ácidas y sustratos susceptibles de ser degradados. Si nos atenemos a la nomenclatura de De Duve, en principio este tipo de vesícula debe ser considerada un lisosoma secundario. Sin embargo, dado que el pH no es óptimo para que las hidrolasas ácidas degraden a los sustratos presentes y a que no todas las hidrolasas ácidas se encuentran en su forma activa, los endosomas tardíos no son considerados como lisosomas secundarios.

Tratando de conciliar la terminología mencionada anteriormente, los lisosomas primarios serían las vesículas que transportan las hidrolasas ácidas desde el aparato de Golgi. A partir de endosomas, se ensamblarían los lisosomas secundarios. La relación entre lisosoma y endosoma secundario es un punto de controversia. Mientras unos autores sostienen que los lisosomas secundarios se forman a partir de endosomas, otros se inclinan a pensar que los lisosomas son estructuras independientes y que los compuestos que arriban a los endosomas son transportados por medio de vesículas desde los endosomas a los lisosomas. Por último, una teoría que cobra fuerza hoy en día es la denominada "besa y corre", en la cual se sostiene que hay un contacto entre lisosomas y endosomas que permite el intercambio de contenido entre un compartimento y otro sin que haya fusión de vesículas.

Hechos plenamente aceptados son: que el pH de los lisosomas es de 4.5 a 5 y que los compuestos endocitados tardan en llegar a los lisosomas cerca de 90 min. Hoy en día, el endosoma tardío puede ser considerado como la intersección de la ruta biosintética y la ruta endocítica. Por su parte, el lisosoma sería el final de ambas rutas.

Esta ruta de transporte vesicular es seguida para transportar principalmente a aquellas macromoléculas que han sido endocitadas por pinocitosis adsortiva, vía vesículas cubiertas. En esta ruta, el transporte vesicular de macromoléculas sigue una vía en la que hay varias estaciones, es decir, primero los pinosomas transportan las macromoléculas a los endosomas tempranos. De donde son transportadas, vía vesícula a los endosomas tardíos y de este compartimento a los lisosomas. La existencia de este compartimento prelisosomal permite a ciertos receptores escapar a la digestión lisosomal y regresar a la membrana plasmática. En ciertas células, la llegada de una macromolécula endocitada a lisosomas tarda hasta una hora y la disociación del receptor de su ligando a nivel del receptosoma permite que el receptor regrese 10 min después de haber sido endocitado. Únicamente en aquellos receptores cuyo número es autorregulado, dependiendo del número de ligandos presente en el medio, el ligando no se disocia de su receptor por lo que el complejo es transportado hasta las vesículas multivesiculares, donde ambos son degradados (figura 16-12).

De la membrana plasmática al aparato de Golgi

Esta ruta es importante en células secretorias. Evidencias indirectas sugieren que el tráfico de este tipo de vesículas no cubiertas permite la recuperación de las membranas de los gránulos de secreción; de esta forma, al haber un mecanismo concertado entre exocitosis y endocitosis, la célula puede controlar un volumen y superficie celular constantes. No está claro si la ruta de transporte es directa desde la membrana plasmática a la región *trans* del aparato de Golgi, en donde se forman las vesículas secretorias y los lisosomas primeros o hay una estación intermedia que bien pueden ser los receptosomas. En experimentos en los que se marca la membrana plasmática y las células son incubadas en presencia de marcadores que son capturados por endocitosis fluida, se ha visto que las membranas llegan al aparato de Golgi, pero su contenido es detectado en lisosomas (figura 16-13).

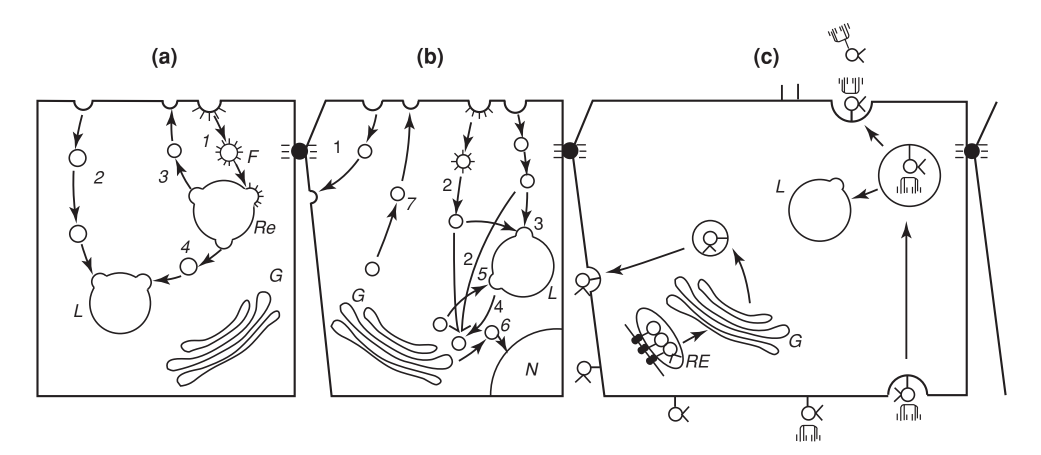


Figura 16-13. Rutas para el transporte de vesículas endocíticas. **a)** De la membrana plasmática a lisosomas. En la membrana plasmática se forman dos tipos de vesículas: cubiertas que transportan a lisosomas ligandos capturados específicamente por un proceso de endocitosis adsortiva, o bien vesículas lisas, las cuales capturan solutos por un mecanismo de pinocitosis fluida. En ambos casos, las moléculas capturadas son transportadas a los lisosomas. El transporte en vesículas cubiertas es por la ruta de los endosomas, ya que provee un mecanismo para el reciclaje de receptores. **b)** De la membrana plasmática al aparato de Golgi. Esta ruta es importante en células fagocíticas y células secretorias, ya que permite una regulación de la superficie y volumen celular. No se sabe con precisión si el transporte es directo desde la membrana al aparato de Golgi o es por la ruta endosómica.
c) Transporte transepitelial. Este tipo de transporte permite el acarreo a través de la barrera formada por endotelios. En b) se muestra la transcitosis para solutos capturados por pinocitosis fluida, el cual transporta moléculas desde el lumen de un vaso al exterior del mismo. En c), se esquematiza la secreción de IgA, la cual es mediada por la proteína J. Esta proteína es sintetizada como proteína integral de membrana, es transportada a la cara basal de células secretorias, en donde actúa como receptor para la IgA. Una vez que se forma el complejo IgA-proteína J, es endocitado y transportado a la superficie de la célula localizada en el lumen del vaso y, en este momento, el receptor es cortado por una endoproteasa que deja libre a la IgA junto con un segmento de la proteína J.

Ruta transcelular

Conocida también como transcitosis, esta ruta, aunque presente en todo tipo celular, es característica de epitelios y endotelios. Este tipo de transporte fue encontrado inicialmente en vasos sanguíneos que irrigan al músculo estriado y corazón. El endotelio forma una barrera impermeable que las proteínas y demás nutrimentos presentes en el suero deben atravesar. En ausencia de transportadores específicos, los componentes séricos son endocitados en vesículas no cubiertas por pinocitosis no adsortiva, las vesículas atraviesan la célula y liberan los compuestos en el otro lado de la célula. La transcitosis puede ocurrir vía receptores específicos; uno de los ejemplos mejor documentados es el transporte de IgG (proveniente de la leche materna de ratas) a través del epitelio del intestino de las crías. La IgG se une a receptores Fc presentes en el lado luminal de las células en cepillo, los complejos receptor-ligando son endocitados en vesículas cubiertas, que son transportadas a través de la célula y liberadas en su lado basal. El pH óptimo de unión en este caso es de 6, que corresponde al del lumen del intestino y el pH óptimo de disociación es de 7.4, que corresponde al del líquido intercelular presente en el lado basal. Aunque este sistema es altamente selectivo, al formarse la vesícula cubierta pueden ser capturados todo tipo de solutos (pinocitosis fluida); por un mecanismo aún no bien entendido, los solutos son transferidos a lisosomas y la inmunoglobulina a la membrana basolateral de la célula. Este sistema de transporte es temporal, ya que desaparece después del periodo de lactancia. Otros sistemas de transporte transepitelial mediado por receptor se ha descrito para inmunoglobulinas en placenta y para la secreción de IgA en el colédoco, en intestino delgado, en las glándulas productoras de lágrimas y en la mucosa nasal (figura 16-13).

Transporte axonal retrógrado

Este tipo de transporte se utiliza para acarrear ligandos específicos desde las terminales nerviosas (sinaptosoma) a través del axón hasta el soma de las células nerviosas. Se han podido detectar dos tipos de receptores para el factor de crecimiento de la célula nerviosa: uno se encuentra en la membrana del receptosoma y el otro tipo de receptores para esta hormona está localizado en la membrana nuclear. La hormona es capturada en vesículas que son transportadas a través del axón por un mecanismo aún no determinado; en el soma, estas vesículas se fusionan con la pared del núcleo.



Referencias bibliográficas

Bainton, D., “The discovery of lysosomes”, *J. Cell Biol.,* **91:** 66s, 1982.

Brodosky, F.M., “Living with clatherin: its role in intracelular membrane traffic”, *Science,* **242:** 1396, 1988.

Brown, M.S. y Goldstein, J.L., “Receptor-mediated control of cholesterol metabolism”, *Science,* **191:** 150, 1976.

Brown, W.J.; Goodhouse, J. y Farquhar, M.G., "Mannose 6-phosphate receptor for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complexes and endosomes", *J. Cell Biol.,* **103:** 1235, 1986.

Dahms, N.M.; Lobel, P. y Kornfeld, S., "Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting", *J. Biol. Chem.,* **264:** 12115, 1989.

De Duve, C., "Lysosomes revisited", *Eur. J. Biochem.,* **137:** 391, 1983.

Dice, J.F., "Selective degradation of cytosolic proteins by lysosomes", *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* **674:** 658, 1992.

Dunn, W.A., "Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole", *J. Cell Biol.,* **110:** 1923, 1990.

Fischer, H.D.; González-Noriega, A. y Sly, W.S., "β-glucuronidase binding to human fibroblasts membrane receptors", *J. Biol. Chem.,* **255:** 5069, 1980.

González-Noriega, A.; Grub, J.H.; Talkad, V. y Sly, W.S., "Chloroquine inhibits lysosomal enzymes pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling", *J. Cell Biol.,* **85:** 839, 1980.

Griffiths, G. y Gruenber, J., "The arguments for preexisting early and late endosomes", *Trends Cell Biol.,* **1:** 5, 1991.

Harikumar, P. y Reeves, J.P., "The lysosomal pump is electrogenic", *J. Biol. Chem.,* **258:** 10403, 1983.

Helenius, A.; Mellman, I.; Wall, D. y Hubbard, A., "Endosomes", *Trends Biochem. Sci.,* **8:** 245, 1983.

Hers, H.G. y Van Hoof, F., "Lysosomes and Storage Diseases", Academic Press, Nueva York, 1973.

Kornfeld, S., "Traffiking of lysosomal enzymes", *FASB J.,* **1:** 462, 1987.

———, "Structure and function of mannose 6-phosphate/insuline-like grotw factors II receptors", *Annu. Rev. Biochem.,* **1:** 307, 1992.

——— y Mellman, I., "The biogenesis lysosomes", *Annu. Rev. Cell Biol.,* **5:** 482, 1989.

Lloyd, J.B. y Mason, R.W., *Subcellular Biochemistry: Biology of the lysosome,* Plenum Press, Nueva York, **27,** 1996.

Murphy, R.F., "Maturation models for endosome and lysosome biogenesis", *Trends Cell Biol.,* **1:** 77, 1991.

Neufeld, E.F.; Lim, T.W. y Shapiro, L.J., "Inherited Disorders of lysosomal metabolism", *Annu. Rev. Biochem.,* **44:** 357, 1975.

Novikoff, A.B., "The endoplasmic reticulum: A cytochemist's view", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **73:** 2781, 1976.

Pastan, I.H. y Willingham, M.C., "Receptor-mediated endocytosis: Coated pits, receptosomes and the Golgi", *Trends Biochem. Sci.,* **8:** 250, 1983.

Pears, B.M.F. y Robinson, M.S., "Clatherin, adaptors and sorting", *Annu. Rev. Cell Biol.,* **7:** 151, 1990.

Robinson, M.S., "Coated vesicles and protein sorting", *J. Cell Sci.,* **87:** 203, 1987.

———, "Adaptins", *Trends Cell Biol.,* **2:** 293, 1992.

——— y Depta, H., "Coated vesicles", *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.,* **39:** 53, 1988.

Rodman, J.S.; Mercer, R.W. y Sthal, P.D., "Endocytosis and transcytosis", *Curr. Opin. Cell Biol.,* **2:** 664-672, 1990.

Rouslahti, G., "Structure and biology of proteoglycans", *Annu. Rev. Cell Biol.,* **4:** 229, 1988.

Rudnick, G., "ATP-driven H^+ pumping into intracellular organelles", *Annu. Rev. Physiol.,* **48:** 403, 1986.

Sandoval, I.V.; Arredondo, J.J.; Alcalde, J.; González-Noriega, A.; Vandekerckhove, J.; Jiménez, M.A. y Rico, M., "The residues Leu (Ile)^{475}-Ile (Leu, Val, Ala)^{476}, con-

tained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes", *J. Biol. Chem.,* **269:** 1, 1994.

——— y Bakke, O., *Trends Cell Biol.,* **4:** 292, 1994.

Smythe, E. y Warren, G., "The mechanism of receptor mediated endocytosis", *Eur. J. Biochem.,* **202:** 689, 1991.

Sorkin, A. y Waters, C.M., "Endocytosis of growth factor receptors", *Bioessays,* **15:** 375, 1993.

Steinman, R.M.; Mellman, I.; Mukller, W.A. y Cohn, Z.A., "Endocytosis and the recycling of plasma membrane", *J. Cell Biol.,* **96:** 1, 1983.

Stevens, T. y Forgee, M., "Structure, function and regulation of the vacuolar (H^+) ATPase", *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.,* **13:** 779, 1997.

Storrie, B. y Desjardis, M., "The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process?", *Bioessays,* **18:** 895, 2000.

Sztul, E.S.; Melacon, P. y Howell, K.E., "Targeting and fusion in vesicular transport", *Trends Cell Biol.,* **2:** 381, 1992.

Taylor, R.B.; Duffus, W.P.H.; Raff, M.C. y Petris, S., "Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobuline antibody", *Nat. New Biol.,* **233:** 225, 1971

Trowbridge, I.S., "Endocytosis and signals for internalization", *Curr. Opin. Cell Biol.,* **3:** 634, 1991.

Vaux, D., "The structure of an endocytosis signal", *Trends Cell Biol.,* **2:** 189, 1992.

Von Figura, K., "Molecular recognition and targeting of lysosomal proteins", *Curr. Opin. Cell Biol.,* **3:** 642, 1991.

——— y Hasililik, A., "Lysosomal enzymes and their receptors", *Annu. Rev. Biochem.,* **55:** 167, 1986.

White, J.M., "Membrane Fusion", *Science,* **258:** 917, 1992.

Wilson, D.B., "Cellular transport mechanisms", *Annu. Rev. Biochem.,* **47:** 933, 1978.

PARTE III

La célula y su microambiente



Micrografía electrónica de una célula vegetal en donde se observa la pared celular (p) cercana al aparato de Golgi y al retículo endoplásmico rugoso.

CAPÍTULO 17

MATRIZ EXTRACELULAR

Annie Pardo Semo ■ Moisés Selman Lama



Introducción

El material que se encuentra fuera de las células, entre los límites epitelial y endotelial de los animales multicelulares, se conoce como matriz extracelular. Su presencia en los diferentes órganos es muy variable; así, en la piel, cartílago, tendón y hueso es un componente muy abundante, mientras que en el cerebro y médula espinal es más escaso. La matriz también forma parte de una serie de pequeñas estructuras que incluyen a los ligamentos elásticos, la córnea, el revestimiento transparente del globo ocular, diversas membranas como las que están en la base de los epitelios y endotelios, redes reticulares en los órganos, vasos sanguíneos y paredes intestinales, láminas asociadas con los músculos y nervios, membrana alveolocapilar a través de la cual se realiza el intercambio gaseoso en el pulmón, membrana glomerular por la cual se eliminan productos de desecho en el riñón, el espacio estructural por donde se movilizan nutrientes en la placenta y tracto gastrointestinal. Además, la matriz puede calcificarse, formando estructuras duras como el hueso o los dientes, o puede adoptar una organización parecida a "cordones", como en el tendón al cual le confiere su enorme fuerza mecánica.

> El material que se encuentra fuera de las células, entre los límites epitelial y endotelial de los animales multicelulares, se conoce como matriz extracelular.

La matriz extracelular (MEC) desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad estructural de los organismos multicelulares, de la forma de su cuerpo y de sus órganos. Sin embargo, este material estructural está lejos de ser una sustancia de soporte inerte como se pensaba en el pasado y, por el contrario, ahora sabemos que la matriz desempeña un papel activo y complejo en la regulación de procesos básicos de las células que tienen contacto con ella. Así, por ejemplo, la MEC ejerce una función moduladora del crecimiento, migración, proliferación y diferenciación celular, así como de la muerte celular programada (apoptosis) entre otras. Muchas de estas actividades son reguladas por un conjunto de señales que se registran directamente a través de receptores a las moléculas de matriz tales como las integrinas.

> La matriz extracelular (MEC) desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad estructural de los organismos multicelulares, de la forma de su cuerpo y de sus órganos.

Hallazgos recientes muestran que la MEC sirve además como un sitio de almacenamiento para factores de crecimiento polipeptídicos. Dos categorías de factores de crecimiento se almacenan en la MEC: factores que se asocian con el heparán-sulfato extracelular, tales como la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos y factores que se unen a proteínas de la MEC, entre los que destacan el factor de necrosis tumoral alfa y el factor de crecimiento transformante beta (TNFα y TGFβ1, por sus siglas en inglés).

> La MEC está conformada por una gran variedad de moléculas.

La MEC está conformada por una gran variedad de moléculas, las cuales interaccionan entre sí, generando una estructura tridimensional a la cual las células se adhieren ya sea por receptores específicos o ligandos. Las macromoléculas que constituyen la MEC incluyen, entre otras, a la familia de las colágenas, que son las responsables de la resistencia mecánica de los tejidos conjuntivos, la elastina que le confiere cualidades de flexibilidad y elasticidad, proteínas de adhesión como fibronectinas y lamininas y los proteoglicanos que son esenciales para la adhesividad.

> Existe un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz.

En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz, lo cual ocurre de una manera finamente programada y equilibrada. Por el contrario, una remodelación desequilibrada de la MEC se ha asociado con diferentes procesos patológicos.

El conocimiento relacionado con el número y tipo de moléculas que constituyen la matriz y las funciones que desempeñan en condiciones fisiológicas, así como su papel en algunas enfermedades hereditarias o adquiridas, ha aumentado en los últimos años. Actualmente, se conoce que la artritis reumatoide, la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar, la invasividad de algunos cánceres, el daño pulmonar agudo y la ateroesclerosis, entre otras, representan condiciones patológicas en las cuales existen alteraciones tanto celulares como de diferentes moléculas de la MEC. Así, por ejemplo, las enfermedades fibrosantes se caracterizan por un depósito excesivo de MEC, en especial de colágenas intersticiales. El enfisema pulmonar, por otro lado, representa una entidad nosológica donde ocurre una exagerada degradación de componentes de la matriz como las fibras elásticas. Situación similar se observa en la artritis reumatoide, en la que se presenta una degradación progresiva de moléculas del cartílago.

En este capítulo haremos una revisión de las principales moléculas de la matriz y de las metaloproteinasas involucradas en su degradación.



La superfamilia de las colágenas

> Las proteínas colagénicas son el constituyente principal de las matrices extracelulares.

Las proteínas colagénicas son el constituyente principal de las matrices extracelulares. Su nombre proviene del griego *cola,* que significa pegamento, y *genos,* nacimiento. Las colágenas son las proteínas más abundantes en los animales, de los que constituyen una tercera parte de su masa proteica.

Las colágenas son una clase heterogénea de moléculas que forman parte de una superfamilia de genes altamente relacionados. Históricamente se definen como proteínas estructurales de la matriz, cuya secuencia se caracteriza por repeticiones de una unidad de tres aminoácidos Gly, X y Y.

Sin embargo, este motivo se ha identificado en ciertos dominios de otras proteínas, incluidos la subunidad C1q del complemento, las colectinas, la forma asimétrica de la acetilcolinesterasa, la ficolina, la proteína A del surfactante pulmonar y ciertos receptores de macrófagos.

A la fecha, se han descrito en los vertebrados 18 tipos genéticos de colágenas, todos los cuales tienen en común uno o más dominios con una estructura de triple hélice.

En las colágenas intersticiales, más de 95% de su estructura es de triple hélice, mientras que en otras es sólo una fracción de su masa molecular. La triple hélice consiste en tres cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales tiene la forma de una hélice que gira a mano izquierda con alrededor de 3.3 residuos de aminoácidos por cada vuelta. Estas tres cadenas helicoidales están además enrolladas con un giro a mano derecha, sobreponiéndose una encima de la otra, para producir una estructura de triple hélice (figura 17-1).

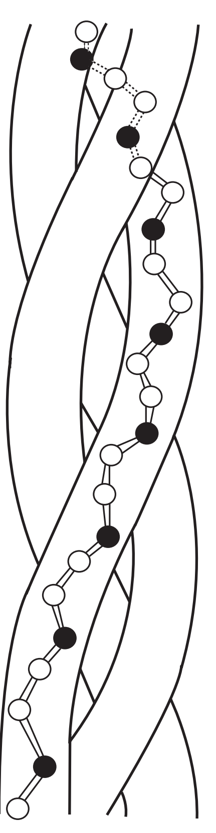


Figura 17-1. Estructura de triple hélice de la colágena formada por tres cadenas polipeptídicas alfa. Las esferas representan residuos de aminoácidos en las que cada tercera posición (esferas oscuras) es glicina.

Este tipo de estructura helicoidal es posible porque, como ya se mencionó, cada tercer aminoácido de los que está constituida esta proteína es una glicina, el más pequeño de los aminoácidos y que por su tamaño cabe en el centro de la superhélice. Por otra parte, en la estructura repetitiva Gly-X-Y de la triple hélice, cerca de 30% de las posiciones X y Y están ocupadas por prolina e hidroxiprolina, respectivamente, iminoácidos que le confieren rigidez y estabilidad a la molécula (Ramachandran y Ramakrishnan, 1976).

Desde la síntesis de la molécula de colágena hasta su depósito en el espacio extracelular, ocurren sucesos postraduccionales extraordinariamente complejos. Dentro de este marco, destaca la formación de hidroxiprolina, un proceso posribosomal que ocurre en aproximadamente la mitad de las prolinas. La enzima responsable de esta hidroxilación, hidroxilasa de prolina, requiere varios cofactores para su acción, entre otros al ácido ascórbico o vitamina C. En el escorbuto, enfermedad descrita en los antiguos navegantes y provocada por falta de vitamina C, la molécula de colágena es deficiente en hidroxiprolina, lo que causa, entre otros padecimientos, lesiones en la piel y las encías, debilitamiento de los vasos sanguíneos y de los ligamentos que sujetan los dientes (Prockop y cols., 1979). Algunos residuos de lisina son también hidroxilados por una enzima específica, y la forma enzimáticamente modificada es la hidroxilisina. Tanto la lisina como la hidroxilisina participan en la formación de entrecruzamientos covalentes entre las cadenas y moléculas de colágena y sirven como sitios de unión para los carbohidratos. Cuando estos entrecruzamientos no ocurren apropiadamente, las fibras de colágena no tienen

la fuerza mecánica necesaria para su función. Esto ha sido demostrado en estudios de latirismo experimental, inducido por la administración de beta-aminopropionitrilo que inhibe la acción de la oxidasa de lisina y evita la formación de los entrecruzamientos en colágena y elastina. Una deficiencia de esta enzima se ha demostrado en pacientes con una forma de *cutis laxa* asociada al cromosoma X. Los entrecruzamientos aumentan con el tiempo; así, una colágena recién sintetizada y depositada en el espacio extracelular tiene pocos entrecruzamientos, pero con el tiempo éstos aumentan y las fibras de colágena se vuelven menos elásticas y más quebradizas. Así, algunos de los signos del envejecimiento se han asociado con la abundancia de entrecruzamientos en las moléculas de colágena.

Las fibras de colágena de un mismo organismo están hechas de distintos tipos de moléculas de colágena y algunos tipos genéticos de esta proteína ni siquiera forman fibras. A los diferentes tipos de colágena se les asigna un número romano que generalmente refleja el orden cronológico en el que fueron descubiertos. Sus cadenas polipeptídicas individuales se llaman cadenas alfa y están numeradas con números arábigos para cada tipo genético de colágena (tabla 17-1).

Tabla 17-1. Tipos de colágena.

TIPO	FORMA	COMPOSICIÓN	DISTRIBUCIÓN
I	Fibrilar	$[\alpha1(I)]_2$ $[\alpha2(I)]$ $[\alpha1(I)_3]$	Piel, hueso, tendón, ligamentos, córnea, etc. Dentina, piel (formas menores)
II	Fibrilar	$[\alpha1(II)]_3$	Cartílago, humor vítreo, notocorda
III	Fibrilar	$[\alpha1(III)]_3$	Acompaña a tipo I en fibrillas heterotípicas: vasos sanguíneos, piel, órganos internos
IV	Reticular	$[\alpha1(IV)]_2$ $[\alpha2(IV)]$ $\alpha3(IV)$ $\alpha4(IV)$ $\alpha5(IV)$	Membranas basales. Membranas basales del glomérulo
V	Fibrilar	$[\alpha1(V)]_3$ $[\alpha1(V)]_2$ $[\alpha2(V)]$ $\alpha1(V)]$ $\alpha2(V)\alpha3(V)$	Acompaña a tipo I en fibrillas heterotípicas, fibrillas delgadas
VI	Filamentosa	$\alpha1(VI)\alpha2(VI)\alpha3(VI)$	Filamentos en rosario de matrices del estroma que interactuan con fibrillas y células
VII	Cadena larga	$[\alpha1(VII)]_3$	Filamentos de anclaje que se unen a membranas basales epiteliales
VIII	Cadena corta	$[\alpha1(VIII), \alpha2\ (VIII)]$¿?	Membranas de Descemet, matrices subendoteliales, cutícula de gusanos, exoesqueleto de esponjas
IX	Asociada a fibras (FACIT)	$\alpha1(IX)\alpha2(IX)\alpha3(IX)$	Superficie de fibras de colágena tipo II en cartílago hialino, humor vítreo
X	Cadena corta	$[\alpha1(X)]_3$	Cartílago hipertrófico
XI	Fibrilar	$\alpha1(XI)\alpha2(XI)\alpha3(XI)$	Acompaña a la tipo II en fibras heterotípicas
XII	Asociada a fibras (FACIT)	$[\alpha1(XII)]_3$	Tendón y piel embrionarios acompaña algunas matrices que contienen tipo I
XIII		$[\alpha1(XIII)]$¿?	Células endoteliales
XIV	Asociada a fibras (FACIT)	$[\alpha1(XIV)]_3$	Piel fetal y tendón
XV		$[\alpha1(XV)]$¿?	

El número creciente de colágenas que se han descubierto ha originado una nueva clasificación en clases para los tipos de colágena que tienen parámetros estructurales similares. A continuación se describirán de manera resumida las características generales de las distintas clases de colágenas, así como los tipos genéticos que las constituyen.

Colágenas fibrilares

Las colágenas tipo I, II, III, V y XI constituyen la clase de las denominadas colágenas formadoras de fibras (tabla 17-1).

Desde las primeras observaciones de los tejidos conjuntivos con el microscopio electrónico de transmisión, fue evidente la presencia de fibras estriadas (Schmitt, 1942). Estas estriaciones se han interpretado, en la colágena tipo I, como alineamientos de moléculas de 300 nm de longitud desfasadas por espacios de 67 nm (una distancia llamada D). En el seno de la fibrilla, el extremo de cada molécula de colágena se desfasa una distancia de 0, 1, 2, 3 o 4 D del extremo de las moléculas vecinas (figura 17-2). El bandeo de las fibras de colágena es muy similar de un tejido a otro, aunque hay diferencias en el empacamiento tridimensional de las moléculas así como en el diámetro de las fibrillas. Estas diferencias pueden ser explicadas, al menos en parte, porque en estas fibras existen diferentes tipos de colágenas estructuralmente homólogas, como son las colágenas fibrilares I, II, III, V y XI (Henkel y Glanville, 1982; Birk y cols., 1989; Mendler y cols., 1989). Algunas de estas colágenas participan, *in vivo,* en la formación de fibras heterotípicas que son fibrillas hechas de más de un tipo de colágena. Por ejemplo, las fibras de colágena de cartílago están formadas por colágenas tipo II y XI, mientras que las fibras no cartilaginosas pueden contener mezclas de colágenas I, III y V.

La similitud estructural entre las colágenas fibrilares se refleja a nivel genético. El DNA se caracteriza por mostrar un alto grado de conservación en sus exones (secuencias de nucleótidos que codifican para aminoácidos)

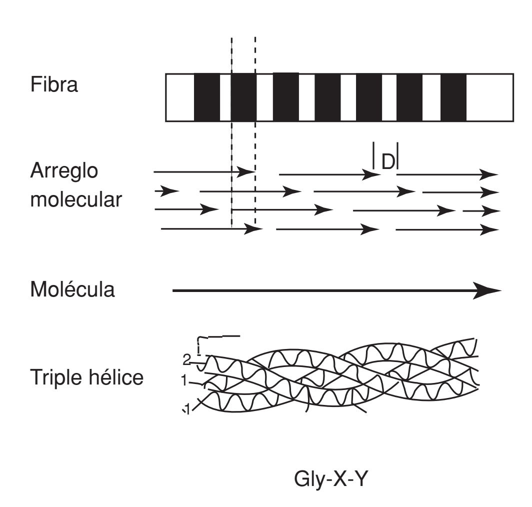


Figura 17-2. Representación esquemática del arreglo de las moléculas de colágena en una fibra**.** La secuencia de aminoácidos representa la estructura primaria. La triple hélice representa la estructura secundaria. Las flechas representan moléculas de colágena de 300 nm de longitud desfasadas por espacios de 67 nm (distancia D). En la parte superior se representa la apariencia estriada de una fibra de colágena observada al microscopio electrónico.

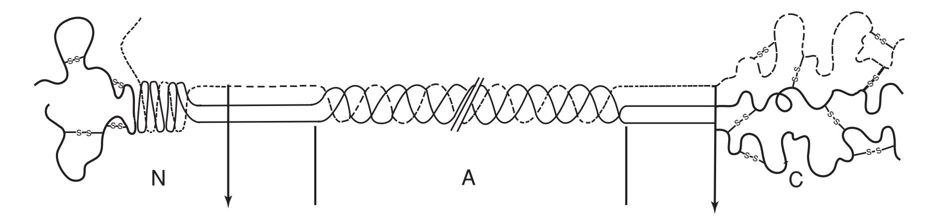


Figura 17-3. Representación esquemática de procolágena. N: péptido amino-terminal; C: péptido carboxiloterminal. A: región de triple hélice. Las flechas representan los sitios de corte de las peptidasas amino- y carboxiloterminales.

e intrones (secuencia de nucleótidos que no se traducen); en particular destaca la predominancia de exones de 54 pares de bases o de múltiplos de 54 (Vuorio y De Crombrugghe, 1990). La conservación de esta estructura genética puede ser rastreada desde los mamíferos hasta especies evolutivamente muy distantes como serían las esponjas o los erizos de mar.

Otro aspecto que comparten las colágenas fibrilares es el procesamiento proteolítico que ocurre en la molécula antes de ser depositada como fibra en el espacio extracelular y que es bien conocido para las procolágenas tipo I, II y III. En estos casos, las moléculas de procolágena, en su salida al espacio extracelular, son sometidas a la acción de enzimas proteolíticas específicas que cortan los péptidos de extensión, en los extremos amino y carboxi-terminales (figura 17-3). La dermatosparaxis de bovinos y el síndrome de Ehlers-Danlos tipo VII en humanos, un defecto caracterizado por extrema fragilidad de la piel, están asociados a la deficiencia genética de la actividad de *N*-proteinasa, la enzima responsable de cortar el extremo amino-terminal (Prockop y cols., 1979). Esto lleva a la acumulación de moléculas de colágenas que contienen péptidos amino-terminales, lo cual impide el empaque normal de estas moléculas en fibras cilíndricas. Por otro lado, dado que el procesamiento normal de las procolágenas origina péptidos amino- y carboxi-terminales, éstos han adquirido importancia clínica como marcadores de síntesis de colágena *in vivo*. Así, se han desarrollado radioinmunoensayos que detectan estos péptidos en fluidos biológicos tanto para el péptido carboxi-terminal de la colágena tipo I como para el amino-terminal de la tipo III y se han aplicado, entre otros, en el análisis de diferentes enfermedades fibrosantes (Risteli y Risteli, 1989).

La colágena tipo I es el prototipo de la colágena fibrilar.

La *colágena tipo I* es el prototipo de la colágena fibrilar y gran parte del conocimiento de las fibras de colágena proviene del estudio de este tipo genético. Es la proteína estructural más abundante en vertebrados, en piel, tendón, ligamentos, córnea y hueso constituye entre 80 y 99% de la colágena total. Está constituida por dos cadenas iguales denominadas alfa 1 y una cadena diferente llamada alfa 2. Mutaciones de los genes de estas cadenas resultan en deleciones, inserciones o sustituciones de aminoácidos en la estructura primaria de la proteína. La mayoría de estos defectos producen cambios fenotípicos en el desarrollo de los huesos que se presentan en los pacientes con osteogénesis imperfecta (Burgeson y Nimni, 1992).

Por otro lado, se ha encontrado otra forma molecular de colágena tipo I que está constituida por tres cadena alfa 1. De esta forma homotrimérica, se han comunicado sólo trazas en tejidos normales y su significado biológico no se conoce con precisión.

La *colágena tipo III* se encuentra asociada a la colágena tipo I en cantidades variables en los diferentes órganos. Su proporción relativa en la piel fetal es considerablemente mayor que en la piel del neonato y en la piel adulta. La molécula de colágena tipo III está formada por tres cadenas idénticas y se caracteriza por tener un alto grado de hidroxilación de prolina, un mayor contenido de glicina y por la presencia de cisteínas en el extremo carboxiloterminal, lo que induce la formación de enlaces disulfuro. Se ha correlacionado la colágena tipo III con la extensibilidad tisular, lo que sugiere que este tipo de colágena puede contribuir a las propiedades biomecánicas de los tejidos que la contienen. Esta hipótesis estaría apoyada por estudios en el síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV que se caracteriza por mutaciones en el gen de la colágena tipo III y que resulta en una mayor fragilidad de la piel y vasos sanguíneos junto con una menor flexibilidad (Harrison y Laurent, 1991).

La *colágena tipo V* se descubrió inicialmente en la placenta humana. Este tipo de colágena es particularmente abundante en el tejido vascular, donde parece ser sintetizada por células de músculo liso. Se han comunicado varias formas moleculares para este tipo de colágena, que incluyen un homotrímero de cadenas alfa 1, un heterotrímero de dos cadenas alfa 1 y una cadena alfa 2 y otro heterotrímero formado por tres cadenas diferentes de alfa 1, alfa 2 y alfa 3. La composición de aminoácidos de esta colágena es semejante a la de las colágenas intersticiales, excepto por su alta proporción relativa de residuos de hidroxilisina en comparación con lisina. El procesamiento normal de la colágena tipo V parece ser más complejo que el de otras colágenas intersticiales; los productos finales de este procesamiento son mayores que sus contrapartes en otras colágenas, de manera que las moléculas de colágena tipo V, normalmente incorporadas en los tejidos, parecen moléculas de procolágena parcialmente procesadas. Estudios de fibrilogénesis *in vitro,* empleando mezclas de colágena tipos I y V, sugieren que esta última podría funcionar regulando el diámetro de las fibras; en este sentido, entre mayor el porcentaje de colágena tipo V incorporada en una fibrilla heterotípica, menor el diámetro de la fibrilla formada. La colágena tipo V se encuentra en el interior de la fibrilla lo que sugiere que puede estar involucrada en procesos iniciales de la fibrilogénesis (Birk y cols., 1990).

La *colágena tipo II,* característica de los tejidos cartilaginosos, constituye un tipo genético de colágena muy relacionada con la tipo I. Las moléculas de colágena tipo II son homotrímeros de cadenas alfa 1 que tienen un alto contenido de hidroxilisinas, muchas de la cuales están glicosiladas. Este tipo de colágena es el principal componente de los cartílagos, y mutaciones genéticas se han detectado en diversos tipos de condrodisplasia (Godfrey y Hollister, 1988).

La *colágena tipo XI* también se localiza en el tejido cartilaginoso. Las moléculas de esta proteína están formadas por heterotrímeros de cadenas alfa 1, alfa 2 y alfa 3 (Morris y Bachinger, 1987). Existe evidencia de que las fibras en las que se encuentra este tipo de colágena son polímeros constituidos por colágenas tipo II y tipo XI y se ha especulado que regula el diáme-

tro o el crecimiento de las fibras de colágena tipo II. En este mismo contexto, se ha sugerido que la colágena tipo XI en cartílago es homóloga en estructura y función a la colágena tipo V en matrices no cartilaginosas.

Datos recientes de colágenas fibrilares en esponjas han revelado que la estructura de esta colágena de invertebrados presenta una similitud significativamente mayor a la colágena tipo XI de vertebrados que a ninguna otra colágena fibrilar de vertebrados (Exposito y Garrone, 1990).

Colágenas asociadas a fibras

Las *colágenas tipo IX, XII y XIV* participan en la formación de fibras junto con las colágenas fibrilares; sin embargo, no son capaces de formar agregados supramoleculares y no forman fibras por sí mismas. A esta clase de moléculas se les ha llamado "colágenas asociadas a fibras con interrupción en triple hélice" (FACIT, *fibril-associated collagens with interrupted triple helixes*) (Gordon y Olsen, 1990). Estas colágenas comprenden los tipos IX, XII y XIV y se han agrupado en una subclase especial dentro de la superfamilia de la colágena porque todas comparten regiones de alta homología y tienen características estructurales únicas. La estructura de estas moléculas se puede dividir en tres regiones funcionales. Una región comprende uno o dos dominios en triple hélice que sirven de interacción de estas moléculas a las fibras. Una segunda región comprende otro dominio en triple hélice que constituye un brazo rígido que se proyecta hacia fuera de la fibra y una tercera región que no se encuentra en triple hélice y a través de la cual se establece la interacción con otros elementos de la matriz o con células. Las regiones en triple hélice están separadas por dominios cortos que no tienen la estructura triple helicoidal (Van der Rest y Garrone, 1991). Este tipo de colágenas no presentan un procesamiento proteolítico a partir de precursores mayores, es decir, se secretan como se sintetizan.

La *colágena tipo IX* es la mejor caracterizada de este grupo y se encuentra en matrices que contienen colágena tipo II como principal estructura formadora de fibras. Está constituida por tres cadenas polipeptídicas distintas que presentan tres dominios en triple hélice y cuatro no colagénicos. Uno de los dominios no colagénicos tiene condroitín-sulfato unido covalentemente a la cadena alfa 2, lo que le facilita la interacción con otros componentes de la matriz (Vand der Rest y Mayne, 1987). La localización de la colágena tipo IX en la superficie de colágenas fibrilares del cartílago sugiere que estas moléculas están involucradas en la interacción de las fibrillas entre sí o con otros componentes de la matriz extracelular.

La *colágena tipo XII* es una molécula con homología estructural parcial a la colágena tipo IX y consiste en tres cadenas alfa 1. Estudios de inmunofluorescencia han demostrado que la colágena tipo XII está localizada en el tejido conjuntivo denso que contiene fibras de colágena tipo I, como son los tendones, ligamentos, pericondrio y periostio (Gordon y cols., 1990). Ésta y otras evidencias sugieren que este tipo de colágena interacciona con fibras tipo I de una manera similar a la asociación entre colágena tipo IX y las fibrillas que contienen tipo II.

La *colágena tipo XIV,* recientemente descrita en piel y tendón, es un homotrímero con la estructura característica de las colágenas FACIT y que tiene un alto grado de homología con la colágena tipo XII (Dublet y Van der Rest, 1991).

Colágenas que forman láminas

Un grupo diferente de colágenas participan en la formación de láminas o membranas proteicas que rodean tejidos u organismos. Ejemplifican este tipo de estructuras las membranas basales, membranas de Descemet, cutículas de gusanos y esqueletos orgánicos de esponjas. En esta clase de colágenas, las similitudes entre los tipos genéticos que la componen son menos evidentes que en las clases anteriormente descritas, y mientras algunos autores han agrupado aquí a las colágenas tipo IV, VIII y X, otros las dividen en dos clases diferentes, las colágenas de membranas basales (tipo IV) y las de cadena corta (tipos VIII y X).

La *colágena tipo IV* fue la primera colágena no fibrilar extensamente estudiada y es un componente de las membranas basales, en las que forma una fina red de cordeles entrelazados que atrapan a moléculas de gran tamaño como laminina o el proteoglicano heparán-sulfato (Timpl, 1989). Se ha sugerido que la colágena tipo IV puede representar a una familia de moléculas, ya que se ha demostrado que existe en diferentes formas moleculares: un heterotrímero formado por cadenas alfa 1 y alfa 2 en una relación 2:1, y un heterotrímero compuesto de tres cadenas adicionales denominadas alfa 3, alfa 4 y alfa 5 (Hostikka y cols., 1990). Las cadenas de colágena tipo IV son estructuralmente similares y combinan un dominio largo en triple hélice con un dominio globular complejo en el extremo carboxilo-terminal. Las moléculas de colágena tipo IV se asocian a través de su extremo amino-terminal triple helicoidal en agregados tetraméricos que se sobreponen en forma paralela y antiparalela. A esta región de sobreposición tetramérica se le denomina 7S (Yurchenko y Schittny, 1990). Se han identificado cadenas laterales de heteropolisacáridos como glucosamina, manosa, galactosa, fucosa y ácido siálico, formando parte de las moléculas de colágena tipo IV; esto le confiere a este tipo de colágena el nivel más alto de carbohidratos. La colágena tipo IV también ha sido caracterizada en varios invertebrados y aparece altamente conservada durante la evolución. En relación a su posible participación en procesos patológicos, se han comunicado defectos genéticos en la cadena alfa 5 en el síndrome de Alport y la cadena 3 ha sido identificada como el antígeno del síndrome de Goodpasture.

La *colágena tipo VIII* se llamó originalmente colágena de células endoteliales por ser sintetizada por células endoteliales de la aorta y la córnea; sin embargo, evidencias recientes sugieren que tiene una distribución tisular mucho mayor (Sage e Iruela-Arispe, 1990). Se ha sugerido que la estequiometría de las cadenas que forman la colágena tipo VIII podría ser de dos cadenas alfa 1 y una cadena alfa 2, pero las evidencias experimentales a la fecha son insuficientes. La estructura de la molécula ha sido motivo de controversia y se han propuesto dos modelos para este tipo de colágena. Sobre la base de datos obtenidos a partir de la secuencia de su cDNA, se ha sugerido que la estructura de esta

proteína, tanto en tamaño como en organización de dominios, debe ser muy semejante a la de la colágena tipo X, ya que los cDNA de ambas son muy similares (Yamaguchi y cols., 1989). La organización supramolecular de la colágena tipo VIII se conoce en la matriz subendotelial que separa las células endoteliales del estroma de la córnea (membranas de Descemet), en la que muestra pilas de redes hexagonales de colágena. No se sabe si una organización similar existe en la matriz de otros tejidos que contienen colágena tipo VIII.

La *colágena tipo X* tiene 138 nm de longitud, que es aproximadamente la mitad de la de las colágenas intersticiales. La secuencia de aminoácidos, estructura genética y organización molecular es muy similar a la de la colágena tipo VIII, razón por la cual se le ha incluido en esta clase de colágenas, aunque no hay evidencia de que forme láminas. La molécula es un homotrímero de tres cadenas alfa 1 y tiene un patrón de distribución tisular muy restringido, siendo sintetizada por condrocitos hipertróficos durante el proceso de osificación endocondral. En el esqueleto fetal y hasta la adolescencia, esta molécula es un intermediario transitorio en el cartílago que será reemplazado por hueso; en el adulto persiste en la zona de cartílago calcificado que separa el cartílago articular del hueso subcondral (Vand der Rest y Mayne, 1987).

Colágena tipo VI formadora de filamentos en rosario

Esta colágena, originalmente llamada íntima, ha sido observada en la mayoría de las matrices extracelulares. La molécula es un ensamble heterotrimérico de tres cadenas genéticamente distintas, alfa 1, alfa 2 y alfa 3, y forma estructuras consistentes en regiones filamentosas que alternan con regiones en rosario (Timpl y Engel, 1987). Contiene secuencias de aminoácidos que parecen desempeñar un papel central en la interacción de componentes de matriz con receptores celulares del tipo de las integrinas. La red de filamentos de colágena tipo VI se encuentra junto con fibras clásicas de colágena y se ha especulado que puede desempeñar el papel de interfase entre la red de fibras y las células. La síntesis o depósito aumentado de colágena tipo VI se ha notificado en algunas enfermedades fibróticas y osteoartrosis y en fibroblastos derivados de pacientes con *cutis laxa* (Timpl y Engel, 1987).

Colágena tipo VII formadora de fibras de anclaje

Existen pocos datos sobre la estructura primaria de este tipo de colágena, aunque es la más grande descrita hasta la fecha. Es un homotrímero de cadenas alfa 1 y su distribución tisular se correlaciona con la de fibras de anclaje que son estructuras fibrilares especializadas en la lámina subbasal (Burgeson, 1987). La colágena tipo VII es sintetizada por queratinocitos y se ensambla en dímeros antiparalelos que se sobreponen cada 60 nm. En los tejidos, estos dímeros forman la mayor parte, si no la única, de las fibras de anclaje que son estructuras largas y estriadas, sobre las que descansan algunos epitelios escamosos estratificados. Estas estructuras se unen por sus extremos a las membranas basales epiteliales. La red resultante atrapa físicamente a las fibras de colágena intersticial y contribuye significativamente a la adhe-

rencia de las membranas basales del epitelio al estroma. Esta función está demostrada por el fenotipo de la epidermólisis distrófica recesiva, en la cual en condiciones de estrés mecánico leve se forman bulas que ocurren por la separación de las membranas basales del epitelio del estroma. En esta enfermedad se han identificado bioquímica e histológicamente anormalidades en la colágena tipo VII (Bruckner-Tuderman y cols., 1989).

Colágena tipo XIII se ha determinado sólo a nivel de cDNA y se ha deducido que los presuntos productos de traducción contendrían tres dominios en triple hélice. Se ha demostrado también la síntesis de esta colágena a partir de anticuerpos producidos contra péptidos sintetizados, deduciéndolos por la secuencia del cDNA. La función de esta colágena se desconoce (Pihlajaniemi y Tamminen, 1990).

Colágenas tipo XV y XVIII se caracterizan por la presencia de dominios múltiples no colágenicos que se acompañan de secuencias colagénicas. Contienen un patrón único de 4 residuos de cisteína en el dominio carboxiloterminal no colagénico. Ambas colágenas se encuentran en la mayoría de los tejidos. Los genes que codifican para los tipos XV y XVIII son altamente homólogos, indicando que estas colágenas se derivan de un ancestro común. Sus funciones se desconocen (Hopkinson y Jones, 1996).

Colágena tipo XVII es una proteína de 180 kDa, componente del hemidesmosoma, que es una estructura del anclaje de la célula epitelial matriz. Es una proteína transmembranal que no se secreta y a la cual se le ha llamado colágena XVII (Rehn y Pihlajaniemi, 1996).

Es muy probable que la lista de colágenas de vertebrados que aquí se ha presentado resulte incompleta en poco tiempo. El desarrollo de métodos cada vez más sensibles ha permitido la identificación de numerosas moléculas pertenecientes a esta familia de proteínas.



Fibronectinas

Las fibronectinas constituyen una familia de glucoproteínas multifuncionales, que se pueden encontrar tanto en forma insoluble, formando parte de la MEC, como en forma soluble circulando en el plasma.

Las moléculas de fibronectina están constituidas por 2 subunidades polipeptídicas de 230 y 250 kDa, respectivamente, que se encuentran ligadas por uniones de disulfuro (Ruoslahti, 1996).

> Las moléculas de fibronectina están constituidas por 2 subunidades polipeptídicas.

Los más de 20 miembros que constituyen esta familia derivan de un gen estructural único que presenta procesamiento alternativo del RNA y posteriormente diferentes modificaciones postraduccionales, que pueden incluir glicosilación, fosforilación y sulfatación. El procesamiento alternativo ocurre en tres sitios del transcrito primario y da origen a los múltiples polipéptidos que forman la familia de las fibronectinas (Kornblihtt y cols., 1996).

La estructura de la fibronectina está fuertemente conservada en la escala evolutiva y es altamente repetitiva, con tres unidades básicas, denominadas homologías tipos I, II y III, las cuales constituyen el esqueleto de la proteína (Patel y cols., 1987).

> La estructura de la fibronectina está fuertemente conservada en la escala evolutiva.

Existen 12 homologías tipo I, de aproximadamente 45 residuos de extensión, las cuales están involucradas en la actividad de unión a fibrina. En

esta área se localiza además un sitio de unión de baja afinidad para heparina. Intercaladas en el agrupamiento amino-terminal de las homologías tipo I se encuentran dos homologías tipo II, las cuales son probablemente parte del sitio de unión a colágena. Esta actividad de unión está directamente dirigida contra colágena tipo I denaturalizada (gelatina), aunque también es activa para otros tipos de colágenas. Se ha sugerido que esta interacción es probablemente importante en el anclaje de las células a las moléculas de colágena *in vivo*.

Finalmente, entre dos agrupamientos de homologías tipo I, se interpone una larga región compuesta por 15 a 17 homologías tipo III. Esta región es responsable de varias actividades de unión, destacando entre ellas las interacciones con receptores de la superficie celular y una unión de alta afinidad con la heparina. Por otro lado, esta región tipo III es responsable de todas las variaciones en la estructura primaria de la fibronectina, que resultan del procesamiento alternativo del pre-mRNA en tres sitios conocidos como extradominio B, extradominio A y segmento de conexión tipo III (figura 17-4).

La fibronectina desempeña un papel fisiológico importante no sólo en la formación de la matriz extracelular, sino además en la adhesión y migración celular, en la opsonización y en la cicatrización de las heridas, entre otras (Kornblihtt y Gutman, 1988).

De manera relevante, la fibronectina extracelular actúa como sustrato para la adhesión celular durante la embriogénesis y la organogénesis y en este aspecto se ha demostrado que participa en múltiples sistemas como, por ejemplo, en la gastrulación, en la migración de células de la cresta neural, en la diferenciación de las células hematopoyéticas y en el desarrollo cardiaco y pulmonar entre otras. Para tal efecto, las células interactúan con la fibronectina vía un receptor de membrana, el cual es una proteína dimérica que contiene subunidades α y β de 140 y 120 kDa, respectivamente (Pytela y cols., 1985).

Por otro lado, la fibronectina plasmática, que se encuentra en una concentración de 0.3 g/L, parece estar implicada en varias actividades biológicas tales como la organización del coágulo y el aclaramiento de diferentes partículas por el sistema reticuloendotelial. Esta última función de opsonización podría estar relacionada con la capacidad que tiene la fibronectina de unirse a fibrina, restos tisulares y bacterias, y de esta manera se encuentra implicada como parte de los mecanismos de defensa contra patógenos.

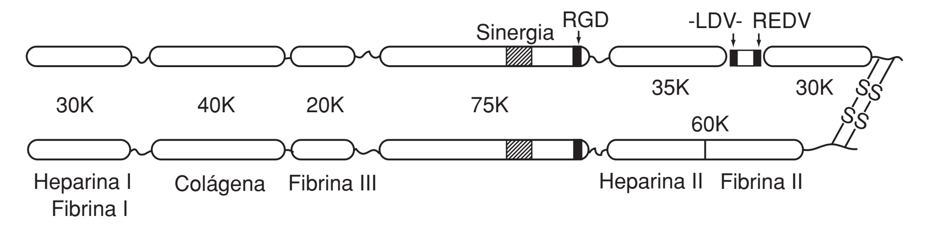


Figura 17-4. Estructura de un dímero de fibronectina. Las dos cadenas polipeptídicas similares provienen del mismo gen, pero con procesamiento diferente del mRNA.

Finalmente, la fibronectina también parece desempeñar un papel en la reparación de los tejidos y la cicatrización de las heridas. En este sentido, se sabe que la fibronectina y la fibrina se concentran inmediatamente en las áreas lesionadas donde forman una matriz provisional que favorece el ensamblaje del tejido de granulación. En esta actividad participan primero la fibronectina plasmática que sale de la circulación en las etapas tempranas y, más tarde, la fibronectina sintetizada *in situ* (Babu y cols., 1989).



Tenacinas

Las tenacinas constituyen una familia de proteínas multiméricas de matriz extracelular conformadas por módulos estructurales repetidos que incluyen repeticiones de setena, de fibronectina tipo III, de un fragmento similar al factor de crecimiento epidérmico y de un dominio globular compartido con los fibrinógenos.

A la fecha, se han descrito tres miembros de esta familia: la tenacina-C, la tenacina-R y la tenacina-X (Erickson, 1993). La tenacina-C fue el primer miembro que se descubrió, entre otras razones porque se sobreexpresa en tumores. Esta molécula se encuentra presente en un gran número de tejidos en desarrollo, incluyendo el sistema nervioso central, pero no se encuentra en el músculo esquelético ni en el cardiaco. La tenacina-R parece ser específica del sistema nervioso central y periférico, mientras que la tenacina-X es más prominente en el músculo esquelético y el miocardio.

La *tenacina-C* es una proteína extracelular hexamérica conformada por subunidades de pesos moleculares que oscilan entre 190 a 300 kDa, dependiendo de la especie. Las diferentes subunidades se generan por el procesamiento alternativo de un transcrito primario común, y se encuentran unidas por puentes disulfuro.

Su patrón de expresión tisular es muy variable y depende del estado de desarrollo del organismo analizado. Durante la embriogénesis normal, la tenacina-C es muy prominente en el sistema nervioso central, en la matriz de revestimiento de las vías de las células migratorias, en el mesénquima, especialmente en sitios de interacción mesénquima-epitelio, y en los tejidos conjuntivos en desarrollo (Erickson y Bourdon, 1989).

La fuente celular de esta macromolécula la constituyen principalmente las células gliales, las células satélite que rodean a los axones motores en el sistema nervioso periférico, las células de la cresta neural y las células del tejido conjuntivo adyacentes al epitelio en desarrollo. Más recientemente se ha encontrado evidencia de que la tenacina-C es también producida en algunos tejidos por las células epiteliales (Koch y cols., 1991).

La función *in vivo* de la tenacina-C se desconoce, pero se ha sugerido que es una proteína que modula la adhesión celular en algunos tejidos, a través de su unión a diferentes integrinas.

La *tenacina-R* tiene los mismos dominios que la tenacina-C, pero, a diferencia de ésta, nunca forma hexámeros. En general, las preparaciones de tenacina-R contienen una mezcla de monómeros, dímeros y trímeros. Estudios con hibridación *in situ* han mostrado que la tenacina-R en el ratón se encuentra

exclusivamente en el sistema nervioso central y es principalmente expresada por oligodendrocitos durante la mielinización y por las neuronas en estadios tempranos de desarrollo (Wintergerst y cols., 1993). La expresión neuronal de tenacina-R persiste en el sistema nervioso central adulto. En el sistema nervioso de los pollos en desarrollo, esta molécula se ha encontrado en el cerebelo, la retina y los axones motores de la médula espinal (Rathjen y cols., 1991).

Finalmente, en el año de 1989 se descubrió un gen que se traslapaba con la hebra opuesta del *locus* que codifica para la 21-hidroxilasa/complemento C4 (clase III del complejo principal de histocompatibilidad), al que se le denominó gen X humano. Cuando se analizó la secuencia de este gen se encontró que es altamente homólogo a la tenacina-C y se le denominó *tenacina-X* (Matsumoto y cols., 1992). El transcrito de esta proteína se encuentra ubicuamente expresado en tejidos humanos y muestra sus niveles más altos en músculo y testículos, aunque su función a la fecha es desconocida.

Fibras elásticas

Las fibras elásticas desempeñan un papel fundamental en la estructura de las matrices intersticiales y en la organización tisular. Dependiendo del tejido, otorgan la flexibilidad apropiada y, por otra parte, permiten la resistencia a los procesos de estiramiento. En este sentido, estas fibras se encuentran en cantidades significativas en aquellos tejidos en los cuales la extensibilidad reversible es importante en su función, como ocurre con el pulmón, la piel y las grandes arterias (Davidson y Giro, 1986).

Las fibras elásticas están conformadas por una compleja estructura que contiene elastina, la cual es la proteína responsable de sus propiedades elásticas y proteínas microfibrilares. El examen ultraestructural de las fibras elásticas ha demostrado que la elastina se encuentra en el centro de la fibra, en forma polimérica e insoluble, rodeada de una capa periférica de microfibrillas de 10 a 12 nm de diámetro, de apariencia tubular (Davidson y Giro, 1986; Gibson y cols., 1989). La mayor parte de la fibra madura está compuesta por elastina amorfa (> 90%).

El componente microfibrilar

A pesar de los avances en el conocimiento de la complejidad estructural de las microfibrillas, los mecanismos por los cuales participan en la fibrilogénesis de las fibras elásticas no se conoce con precisión (Clearly y Gibson, 1983). Se ha sugerido que el componente microfibrilar dirige la morfogénesis de las fibras elásticas actuando como el andamio sobre el cual se depositan las moléculas de elastina. Así, las microfibrillas permitirían el alineamiento exacto y ordenado de las moléculas de tropoelastina, de tal manera que las regiones donde ocurrirán las uniones cruzadas queden yuxtapuestas antes de la oxidación por lisiloxidasa.

Aunque la composición precisa de las microfibrillas se desconoce, a la fecha se han identificado algunas de las moléculas que las conforman. Entre és-

tas se encuentran la fibrilina, una glicoproteína de 350 kDa que es su principal constituyente, una proteína de 31 kDa denominada glicoproteína asociada a microfibrillas, una glicoproteína de 34 kDa con actividad de aminooxidasa y la enzima lisiloxidasa. A diferencia de la elastina, las microfibrillas contienen muchos residuos básicos así como numerosas cisteínas. Esta diferencia en la composición de aminoácidos es importante para las interacciones entre la tropoelastina y las microfibrillas durante el ensamblaje de las fibras elásticas.

Elastina

La elastina es una proteína fuertemente hidrofóbica que se sintetiza en forma soluble (tropoelastina), se modifica postraduccionalmente, se empaca y se transporta a sitios específicos de la superficie celular, donde se producen las uniones cruzadas y el ensamble final para la formación de las fibras.

La elastina se caracteriza por presentar una composición de aminoácidos muy peculiar, con un bajo contenido en residuos ácidos o básicos, y una muy alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos, especialmente valina (~15%). Por otro lado, contiene varios derivados de lisina que sirven de base para la formación de las uniones cruzadas covalentes entre los monómeros de elastina, las cuales son fundamentales para las propiedades elásticas de la molécula. La polimerización de la tropoelastina es catalizada por la lisiloxidasa, una enzima dependiente de cobre, la cual desamina los residuos de lisina para formar las uniones cruzadas de desmosina e isodesmosina, dos estructuras que son exclusivas de la elastina de los vertebrados y que pueden usarse como marcadores de la proteína (figura 17-5). Esta modificación resulta en una fibra muy estable, altamente inerte e insoluble (Rucker y Dubick, 1984).

Las propiedades fisicoquímicas responsables de las características elásticas de la elastina no se conocen con precisión. Esta proteína presenta un alto grado de distensibilidad reversible e incluso tiene la capacidad de deformarse en grandes extensiones con pequeñas fuerzas. Uno de los modelos propuestos para explicar esta elasticidad sugiere que las regiones no polares de la elastina se exponen al agua cuando la molécula es estirada y, posterior-

Desmosina

Isodesmosina

Figura 17-5. Desmosina e isodesmosina son aminoácidos especiales que se encuentran en elastina. Están constituidos por la interacción de cuatro moléculas de lisina.

mente, cuando la fuerza responsable de la distensión se retira, los grupos no polares se reagrupan, expelen el agua absorbida y entonces ocurre la retracción (Gosline, 1978).

La tropoelastina, una proteína hidrofóbica de 65 a 70 kDa, es el precursor soluble de la elastina, cuyo mRNA es transcrito de un gen único que se encuentra, en humanos, en el brazo largo del cromosoma 6. El gen de tropoelastina es inusualmente grande, con cerca de 40 kb de secuencia que codifican para un mRNA de ~3.5 kb (Indik y cols., 1990). El transcrito primario de tropoelastina sufre extensos procesamientos alternativos, lo que resulta en la traducción de numerosas isoformas heterogéneas. Esta multiplicidad de isoformas sugiere otras posibles funciones adicionales a la fibrilogénesis de las fibras elásticas y a su condición de elasticidad y, de hecho, la tropoelastina y/o las fibras elásticas podrían estar involucradas en las complejas interacciones fisiológicas que ocurren entre células y matriz, y entre las moléculas de matriz entre sí.

El estudio del cDNA ha confirmado la predicción de que la estructura primaria de la tropoelastina está organizada en dominios con abundantes aminoácidos hidrofóbicos separados de regiones ricas en alanina donde se encuentran, generalmente en pares, los residuos de lisinas, que, como se mencionó, constituyen los sitios de enlaces cruzados.

Posteriormente, ya en el espacio extracelular, la tropoelastina se une a una proteína de membrana que es similar, si no idéntica, al receptor para laminina. Algunos estudios han sugerido que la tropoelastina y su receptor se secretan juntos en la forma de un complejo, lo que sugeriría que el receptor de 67 kDa puede actuar como una proteína chaperonina, presentando a la tropoelastina a las microfibrillas en el medio extracelular (Mecham y cols., 1989). Este receptor se ha encontrado en la mayoría de las células que se unen a elastina.

Adicionalmente, se han descrito otros dos receptores para elastina, una proteína de 120 kDa conocida como elastonectina, que se encuentra en células musculares lisas, y una proteína de 59 kDa que se ha encontrado en células tumorales acoplada a la proteín-cinasa C.

Proteoglicanos

Los proteoglicanos (PG) representan un conjunto peculiar y diverso de proteínas cuyo rasgo estructural común es que todos ellos están conformados por una proteína central, generalmente rica en residuos de serina y treonina, a la cual se unen covalentemente una o múltiples cadenas lineales de carbohidratos conocidos como glicosaminoglicanos. Esta definición permite incluir dentro de esta familia a una variedad de moléculas con un amplio espectro de relación carga/masa y muy diferentes funciones. La heterogeneidad de este grupo de macromoléculas radica principalmente en la gran diversidad de las proteínas que forman su parte central, así como en los tipos, número y grado de sulfatación de las cadenas laterales de GAG que se unen a ella (Ruoslahti, 1988). Esta enorme diversidad estructural contribuye a la amplia variedad de funciones biológicas de los proteoglicanos.

Glicosaminoglicanos

Las cadenas de glicosaminoglicanos (GAG), cuya presencia constituye el rasgo estructural común de estas moléculas, son polímeros lineales sin ramificaciones, que consisten generalmente en una estructura dimérica repetida. Uno de los dos azúcares de este disacárido es siempre el ácido glucurónico o idurónico o la galactosa, el que se alterna con una hexosamina que puede ser la *N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina (Silbert, 1989). Los GAG se unen a una serina de la proteína central por medio de un trisacárido formado por galactosil-galactosil-xilosa.

Por sus características estructurales, los GAG son muy aniónicos, y esto se debe principalmente a sus grupos sulfato y carboxilo. Además, sus ácidos urónicos se encuentran ionizados a pH fisiológico. La relevancia de esta característica radica en que iones positivos, como el sodio, por ejemplo, son atraídos por esta nube de cargas negativas, los que a su vez atraen grandes números de moléculas de agua hacia las cadenas de los GAG. Esto trae como consecuencia un atrapamiento de agua que es el principal responsable de la turgencia de los tejidos. Asimismo, se ha propuesto a este mecanismo como una de las formas de control de retención y flujo de agua, difusión de solutos y migración celular (Ruoslahti, 1988).

Los GAG están representados por: a) la heparina, b) heparán-sulfato, c) condroitín-sulfato, d) dermatán-sulfato, e) keratán-sulfato y f) el ácido-hialurónico (figura 17-6).

Proteoglicanos: localización, tamaños y funciones

Los proteoglicanos (PG) son moléculas ubicuas que pueden ser encontrados, como parte de la matriz extracelular, en las superficies celulares asociadas a la membrana celular o plasmática, o en el interior de las células. En este contexto, tienen múltiples y variadas funciones, entre las que destacan su participación en la organización estructural de los tejidos y en la regulación de algunos factores de crecimiento, a los cuales pueden unirse, almacenar por tiempos variables y liberarlos; asimismo, poseen propiedades adhesivas y antiadhesivas, promueven la angiogénesis y la fibrilogénesis de las moléculas de colágenas.

> Los proteoglicanos son moléculas ubicuas que pueden ser encontrados como parte de la matriz extracelular, en las superficies celulares asociadas a la membrana celular o plasmática, o en el interior de las células.

Los proteoglicanos tienen tamaños extraordinariamente variables. La proteína central puede ser tan pequeña como 10 kDa o tan grande como 400 kDa, a la cual se puede unir una o múltiples cadenas de GAG (Iozzo y Murdoch, 1996) (figura 17-7).

Entre los proteoglicanos grandes se encuentran el *agrecán* y el *versicán*, los cuales forman parte de diferentes tejidos. El agrecán es una macromolécula excepcionalmente compleja presente en el cartílago. La proteína central, con un peso aproximado de 220 kDa, contiene tres dominios globulares, a los que se unen aproximadamente 100 moléculas de GAG conformadas principalmente de condroitín-sulfato (Heinegard y Oldberg, 1989).

El *versicán* es un proteoglicano rico en condroitín- y dermatán-sulfato, cuya proteína pesa ~265 a 370 kDa, y que se ha encontrado en vasos sanguíneos, cerebro, piel y cartílago.

(a) Ácido hialurónico

-1,4-glcUA-β-1,3-glcNAc-β-

(b) Condroitín/dermatán-sulfato

-1,4-glcUA-β / -1,4-*idoUA*-α -1,3-galNAc-β-

(c) Queratán-sulfato

-1,3-gal-β-1,4-glcNAc-β-

(d) Heparán sulfato/heparina

-1,4-glcUA-β / -1,4-*idoUA*-α -1,4-glcNAc-α-

Figura 17-6. Secuencias repetitivas de disacáridos en diferentes tipos de glicosaminoglicanos (GAG).

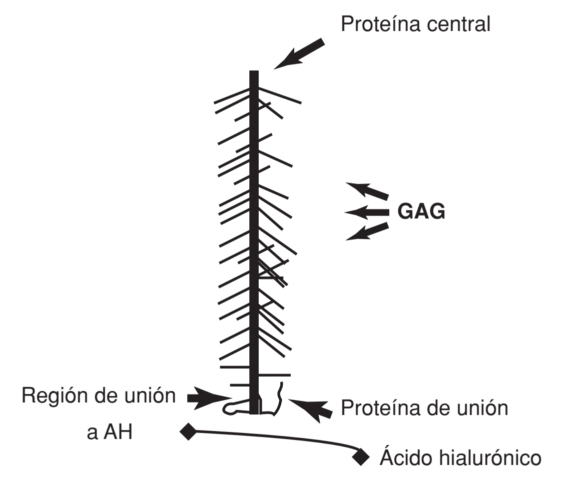


Figura 17-7. Esquema de un monómero de proteoglicano y su relación con una molécula de ácido hialurónico como se encuentra típicamente en cartílago.

Los proteoglicanos pequeños están representados por el *biglicán,* la *decorina* y la *fibromodulina*. Se trata en realidad de una familia de moléculas relacionadas estructuralmente, pero genéticamente diferentes. El corazón proteico tiene una masa molecular de alrededor de 40 kDa y contiene 10 secuencias homólogas repetidas de 25 aminoácidos. La decorina y el biglicán contienen condroitín- o dermatán-sulfato, mientras que la fibromodulina está conformada de cadenas de queratán-sulfato (Iozzo y Murdoch, 1996).

En particular, estos proteoglicanos extracelulares pequeños desempeñan un papel fisiológico importante a través de sus interacciones con diversos factores de crecimiento, así como en la regulación de la fibrilogénesis de las moléculas de colágena. Niveles incrementados de decorina se han notificado en lesiones arterioescleróticas y en articulaciones artríticas, aunque su posible papel en estas patologías no se conoce con precisión.

Existen también PG que forman parte estructural de las membranas basales o que se encuentran asociados directamente con la membrana plasmática celular.

Los PG de las láminas basales son generalmente ricos en cadenas de heparán-sulfato y parecen desempeñar un papel en las propiedades antitrombogénicas del sistema vascular, así como en la regulación de algunos procesos fisiológicos como proliferación, angiogénesis y hematopoyesis. (Edge y Spiro, 1990; Roberts y cols., 1988).

Por su parte, los proteoglicanos asociados a las membranas plasmáticas también contienen heparán-sulfato, pero son diferentes a los de las membranas basales. El más estudiado de ellos es el *sindecán*, el cual se encuentra localizado principalmente en la superficie de las células epiteliales. Sus cadenas de heparán-sulfato interactúan con diferentes proteínas de la matriz extracelular como colágenas I, III y V, trombospondina y fibronectina, mientras que el dominio citoplásmico del sindecán parece estar involucrado con moléculas del citoesqueleto como la actina (Bernfield y Sanderson, 1990).

Finalmente, algunas células derivadas del sistema hematopoyético como los basófilos, plaquetas y células cebadas contienen proteoglicanos intracelulares como por ejemplo, la *serglicina*. En este PG, la proteína tiene ~155 aminoácidos con numerosas repeticiones de serina-glicina y las cadenas de GAG son ya sea heparina o condroitín-sulfato (Lohmander y cols., 1990).

El metabolismo de los PG es un proceso dinámico y altamente regulado. Tanto la síntesis como la degradación son muy activos, de tal manera que la vida media de estas moléculas en la matriz extracelular es de unos cuantos días a unas pocas semanas. Más aún, la vida media de los PG que forman parte de las membranas celulares es generalmente de unas cuantas horas. El estudio de la estructura de estas moléculas, su identificación en las formas tan variadas de matriz extracelular, su interrelación entre ellas, así como con otros miembros moleculares de la matriz extracelular y la comprensión de su regulación genética en condiciones fisiológicas y patológicas, permitirá entender algunas de las funciones en las que los PG se encuentran involucrados (Juul y cols., 1991).

Se han descrito varios procesos patológicos asociados a alteraciones en el metabolismo de los proteoglicanos. Por ejemplo, se ha observado

un aumento en la síntesis de ácido hialurónico en enfermedades como esclerodermia, asma, enfisema, enfermedades fibrosantes y mesoteliomas malignos.

Asimismo, dos anormalidades genéticas letales, la nanomelia en pollos y una deficiencia de matriz cartilaginosa en ratones, se han asociado con un contenido de proteoglicanos en los cartílagos hialinos menor a 5%. Esta anormalidad se origina aun cuando estos cartílagos contienen cantidades normales de colágena tipo II.

Membranas basales

La membrana basal es una estructura especializada de la MEC.

La membrana basal es una estructura especializada de la MEC que separa a las células epiteliales y endoteliales del tejido conjuntivo. Este particular tipo de matriz extracelular organiza y ejerce influencia sobre el comportamiento de las células, regulación que está mediada por la interacción de moléculas específicas de la membrana basal con la superficie celular. Asimismo, tiene un papel estructural muy importante, ya que forma una barrera al pasaje de proteínas y células.

Los principales componentes de la membrana basal son la colágena tipo IV, la laminina, el proteoglicano heparán-sulfato y la entactina.

Los principales componentes de la membrana basal son la colágena tipo IV, la laminina, el proteoglicano heparán-sulfato y la entactina, los cuales interactúan entre sí para producir ensamblajes supramoleculares perfectamente definidos, que tienen el potencial de generar una diversidad de estructuras laminares en diferentes órganos como riñón, vasos sanguíneos, pulmón y músculo. Así, se pueden distinguir dos órdenes de estructura en estas matrices laminares: la estructura molecular de cada componente y la arquitectura supramolecular que resulta de las interacciones específicas entre sus constituyentes moleculares. Las funciones de soporte y tamiz dependen primordialmente de su arquitectura, mientras que las interacciones célula-matriz se asocian con la presencia de determinantes específicos en sus moléculas.

Alteraciones en las membranas basales se asocian con varios procesos patológicos, que incluyen el edema pulmonar agudo, algunas enfermedades fibrosantes, el síndrome de Goodpasture y el desarrollo de metástasis.

La colágena tipo IV y el heparán-sulfato han sido tratados previamente, y a continuación se analizarán brevemente la laminina y la entactina.



Laminina

La laminina tiene una estructura altamente conservada en diferentes especies como en el hombre, ratón, *Drosophila*, sanguijuelas y estrellas de mar. Consiste de tres cadenas polipeptídicas: A (400 kDa), B1 (220 kDa) y B2 (205 kDa), unidas por enlaces disulfuro para formar una estructura en forma de cruz con terminaciones globulares (Sasaki y cols., 1988). Este modelo, que corresponde a la laminina del ratón, parece repetirse en lamininas de otras especies. Cada una de las tres cadenas polipeptídicas se ha subdividido en diferentes dominios numerados del I al VI. El brazo largo rígido contiene fundamentalmente los dominios I y II y tiene una estructura de espiral enrollada (su-

perhélice) que es un producto de las tres cadenas. Esta región es rica en hélices α, en las cuales existen repeticiones de aminoácidos hidrofóbicos localizados en la primera y cuarta posiciones del repetido, favoreciendo la formación de estructuras de espiral enrollada. Los segmentos tipo bastón de los brazos cortos, dominios III y V, consisten en repeticiones de cisteína homólogos al factor de crecimiento epidérmico. Cada uno de éstos contiene de 50 a 60 aminoácidos con ocho residuos de cisteína en posiciones altamente conservadas. Las estructuras globulares que se observan en el microscopio electrónico corresponden a los dominios IV y VI. La terminación globular al final del brazo largo, que deriva únicamente de la región carboxilo de la cadena A, contiene cinco repetidos homólogos como la estructura de un pie y se le llama el dominio G. Los dominios II y IV de la cadena A están subdivididos en subdominios a y b con base en su secuencia de aminoácidos. En la cadena B1 se forma una asa de 40 aminoácidos entre los dominios I y II referido como el dominio alfa. En la laminina de ratón los tres brazos cortos se derivan individualmente de las regiones amino-terminales de las cadenas A, B1 y B2 (Durkin y cols., 1988; Olsen y cols., 1989) (figura 17-8).

La molécula de laminina está extensamente glicosilada y aproximadamente 15 a 30% de su peso consiste en carbohidratos. Hay 46 sitios potenciales de glicosilación en la cadena A y 13 a 14 en las cadenas B1 y B2, aunque la glicosilación no es necesaria para el ensamblaje de las cadenas o su estabilidad. Se ha notificado que la laminina no glicosilada impide la extensión y crecimiento de neuritas. Por otro lado, también se ha señalado que la glicosilación está involucrada con la adhesión de células tumorales a laminina (Chung, 1993).

La molécula de laminina está extensamente glicosilada.

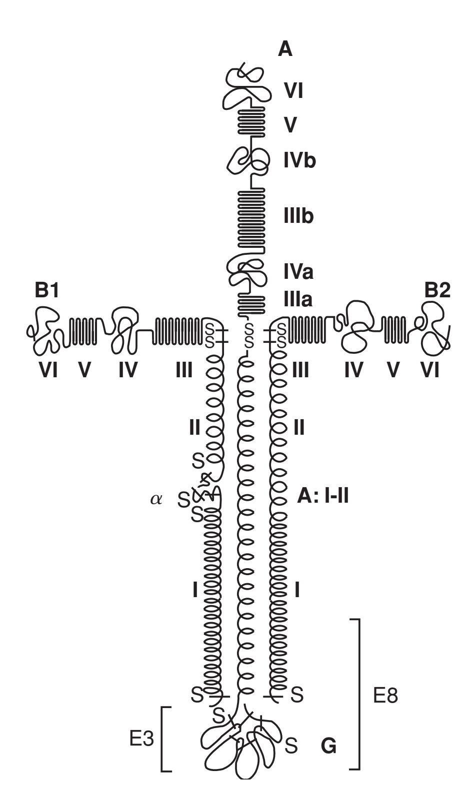


Figura 17-8. Esquema de la laminina de rata. Esta glucoproteína está compuesta de tres cadenas polipeptídicas (A, B1 y B2) que están unidas a través de enlaces disulfuro en una estructura asimétrica cruciforme.

Existen diversas formas de laminina. Así, se ha identificado de placenta humana una molécula que contiene la cadena B de laminina asociada con merosina. La merosina tiene aparentemente el mismo tamaño de la cadena A, con la cual tiene alrededor de 40% de identidad. Otras formas variantes de la laminina incluyen, entre otras, a la laminina M aislada de placenta humana, en la cual la cadena A está reemplazada por una especie variante. Además existen variantes de la laminina en la cadena B1 como es el caso de la s-laminina (Hunter y cols., 1989).

Los cambios en la composición de subunidades de laminina pueden influir no sólo en la interacción con los receptores celulares, sino también en la interacción con otras moléculas de la matriz y, por lo tanto, en la arquitectura de la membrana basal.

La laminina tiene una variedad de actividades biológicas que incluyen la promoción del crecimiento y extensión de neuritas, promoción de la unión celular, migración celular, polarización del epitelio renal durante el desarrollo, diferenciación de las células endoteliales en estructuras capilares e inhibición de metástasis tumorales. Tiene, además, un efecto inductivo en la expresión de genes específicos como el de la beta-caseína en el epitelio mamario (Streuli y cols., 1995).

La laminina forma polímeros *in vitro* en presencia de calcio. El proceso de agregación es reversible y depende de la concentración y temperatura.

En las membranas basales, la laminina se une a la triple hélice de la colágena tipo IV a través de varias regiones diferentes. Por otra parte, un sitio de unión para el heparán-sulfato y la heparina se encuentra en el dominio globular de la cadena A y sitios débiles de unión en los brazos cortos. La laminina tiene una gran tendencia a formar complejos con la entactina.

Los genes de los componentes de la membrana basal se encuentran en diferentes cromosomas. La entactina, las cadenas de laminina B2, laminina B1 y laminina A se han mapeado en los cromosomas 1, 1, 7 y 18, respectivamente. Aunque la familia de la colágena tipo IV está compuesta de por lo menos cinco miembros, ambas cadenas $\alpha1$ y $\alpha2$ están localizadas en el cromosoma 13 (Boyd y cols., 1988).

El gen de la cadena B1 de la laminina está compuesto de al menos 36 exones.

El gen de la cadena B1 de la laminina está compuesto de al menos 36 exones, que comprenden más de 60 kb. La cadena B2 es más pequeña y contiene 28 exones de 60 kb. El perfil de exones de la cadena B1 y B2 difiere significativamente. Los genes de las cadenas $\alpha1$ (IV) y $\alpha2$ tipo IV son muy grandes. El de la $\alpha1$ humana consta de 52 exones con más de 100 kb y parece ser el gen más grande de la familia de las colágenas.

Entactina

La entactina es una glicoproteína sulfatada que forma un complejo muy estable con la laminina y se necesitan condiciones desnaturalizantes para disociar estos dos componentes de la membrana basal. La entactina, cuando se observa al microscopio electrónico, muestra una estructura asimétrica característica, con dos extremos globulares de una masa esti-

mada de 38 y 85 kDa separados por un tronco de 17 nm. La entactina contiene cinco a 13% de carbohidratos en la forma de *N*- y *O*-oligosacáridos y está *O*-sulfatada en residuos de tirosina, que se ha sugerido podrían estar involucrados en interacciones proteína-proteína (Chung y Durkin, 1990).

La secuencia polipeptídica completa de la entactina de ratón y humana se ha deducido de la clonación del cDNA y la estructura secundaria predicha es compatible con la imagen física. La proteína está formada por tres dominios. El dominio I, que corresponde al glóbulo mayor, representa el segmento amino-terminal, el cual está unido por un tronco rico en cisteínas (dominio II) al extremo carboxilo-terminal (dominio III), en un arreglo que recuerda los brazos cortos de la laminina (figura 17-9). El gen de la entactina de ratón se localiza en el cromosoma 6 y el del humano en el cromosoma 1.

El examen de las membranas basales por microscopia electrónica revela que están compuestas de una red tridimensional consistente en filamentos de colágena tipo IV, a la cual se unen laminina, entactina y heparán-sulfato. La entactina forma un complejo no covalente, fuertemente ligado a la laminina, que sólo puede ser separado por agentes desnaturalizantes como la urea. Una molécula de entactina se une a través de uno de sus dominios globulares al segmento interno de uno de los brazos cortos de la laminina. Se ha sugerido que es la cadena B1 (Timpl, 1989). El ensamblaje entre la laminina y la entactina parece ocurrir en la cisterna del retículo endoplásmico rugoso. El complejo laminina-entactina, en ausencia de colágena tipo IV, puede formar una estructura parecida a membranas basales. Además de formar un fuerte complejo con la laminina, la entactina se une con una afinidad menor a la fibronectina y a la colágena tipo IV (Durkin y cols., 1988).

Se ha sugerido que el ensamblaje de las membranas basales ocurre de una manera ordenada, en la cual el complejo laminina-entactina se acopla para formar una estructura supramolecular que se une por puentes de entactina a una red de colágena tipo IV. En este proceso, intervienen varios tipos de interacciones mediadas por calcio.

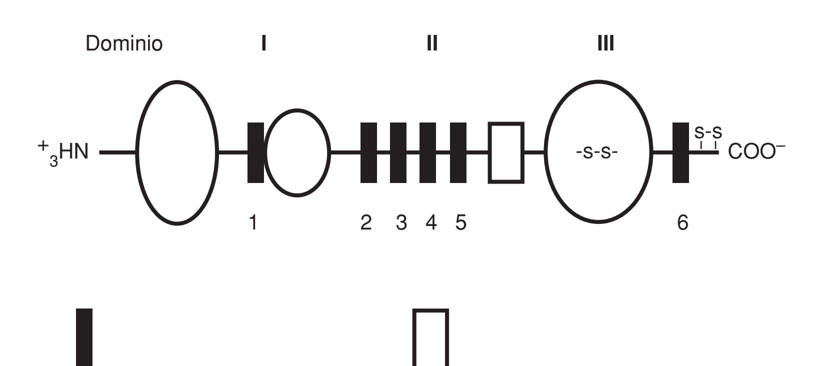


Figura 17-9. Características estructurales principales de la molécula de entactina. La molécula está organizada en tres dominios estructurales.



La familia de las metaloproteinasas de matriz

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son las principales enzimas responsables de la degradación de la matriz extracelular.

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son las principales enzimas responsables de la degradación de la matriz extracelular y desempeñan un papel central en diversos procesos fisiológicos como la morfogénesis, angiogénesis e inflamación (Matrisian, 1992).

Esta familia de endopeptidasas comparte un conjunto de dominios, entre los que se encuentran:

1. Un dominio propeptídico responsable de la falta de actividad de las proenzimas. En este dominio existe un residuo de cisteína que forma un enlace coordinado con el Zn^{2+}, presente en el dominio catalítico, y enmascara de esta manera el sitio activo de las proenzimas o zimógenos.
2. El dominio catalítico esencial para la actividad enzimática y que contiene el sitio de unión a Zn^{2+} y a Ca^{2+}.
3. Una secuencia rica en prolina que funciona como bisagra.
4. Un sitio carboxilo-terminal con un dominio tipo hemopexina (figura 17-10).

Las MMP se pueden clasificar en diferentes subfamilias que incluyen a las colagenasas, gelatinasas, estromelisinas y las metaloproteinasas "tipo membrana".

Las MMP se pueden clasificar en diferentes subfamilias que incluyen a las colagenasas, gelatinasas, estromelisinas y las metaloproteinasas "tipo membrana" (tabla 17-2).

Las colagenasas rompen la región triple helicoidal de las colágenas intersticiales y, a la fecha, tres miembros de este grupo han sido clonados: MMP-1, llamada también colagenasa intersticial de fibroblastos, MMP-8, denominada colagenasa de neutrófilos, y MMP-13 o colagenasa 3, recientemente clonada de un carcinoma humano mamario (Goldberg y cols., 1986; Hasty y cols., 1990; Freije y cols., 1994).

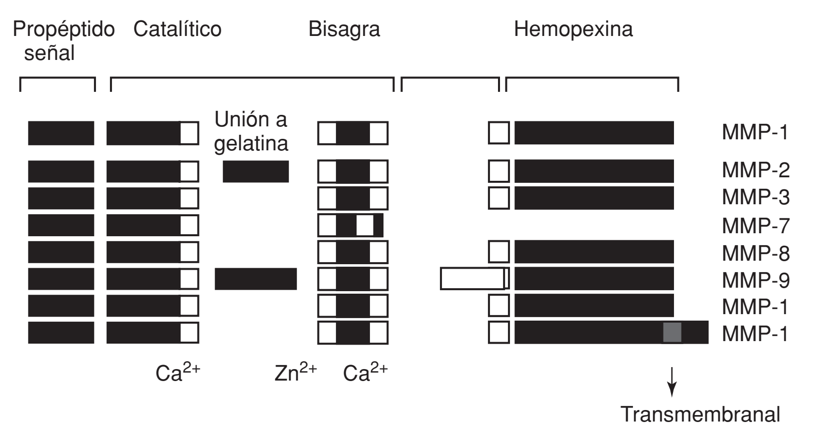


Figura 17-10. Representación esqemática de la estructura de las metaloproteinasas. Un dominio propeptídico que contiene al péptido señal y el propéptido. Un dominio catalítico que contiene el sitio de unión a Zn^{2+} y a Ca^{2+}. Una secuencia rica en prolina que funciona como bisagra y un sitio carboxilo-terminal con un dominio tipo hemopexina.

Tabla 17-2.

Familia de metaloproteinasas
Colagenasas
Colagenasa de fibroblastos (MMP-1)
Colagenasa de polimorfonucleares (MMP-8)
Colagenasa 3 (MMP-13)
Gelatinasas
Gelatinasa A (MMP-2)
Gelatinasa B (MMP-9)
Estromelisinas
Estromelisina 1 (MMP-3)
Estromelisina 2 (MMP-10)
Estromelisina 3 (MMP-11)
Metaloelastasa (MMP-12)
Matrilisina (MMP-7)
Metaloproteinasas de membrana
MT-MMP-1
MT-MMP-2
MT-MMP-3
MT-MMP-4
MT-MMP-5
MT-MMP-6

La subfamilia de las gelatinasas degradan colágena tipo IV, principal constituyente de membranas basales, fibronectina y elastina, y a la fecha se han caracterizado dos miembros de este subgrupo, que son la gelatinasa A (colagenasa tipo IV de 72 kDa/MMP2) y la gelatinasa B (colagenasa tipo IV de 92 kDa/MMP-9) (Collier y cols., 1988; Wilhem y cols., 1989). Ambas enzimas contienen un dominio adicional parecido a fibronectina y la gelatinasa B contiene también una región en el carboxilo-terminal que es semejante a la cadena alfa 2 de la colágena tipo V.

Las gelatinasas degradan colágena tipo IV, principal constituyente de membranas basales.

La subfamilia de estromelisinas tiene una amplia especificidad de sustratos que incluye a la parte proteica de los proteoglicanos, a la fibronectina y la laminina. Varias enzimas se han clasificado tentativamente en este grupo e incluyen a la estromelisina 1 (MMP-3), estromelisina 2 (MMP-10), estromelisina 3 (MMP-11), matrilisina (MMP-7) y la metaloelastasa (MMP-12).

Finalmente, de las recientemente descubiertas metaloproteinasas de membrana (MT-MMP), se han determinado seis enzimas. Este grupo de enzimas se caracteriza principalmente por la presencia de un dominio transmembranal que es una extensión terminal rica en residuos hidrofóbicos. Se ha propuesto que este tipo de enzimas son responsables del procesamiento de varias proteínas en la superficie celular (Sato y cols.,1994).

La regulación de las MMP ocurre en varios niveles tanto intra- como extracelulares y la actividad enzimática es el resultado final de una compleja serie de procesos que incluye la expresión del gen, la activación del zimógeno y la inhibición enzimática en el espacio extracelular.

La expresión genética es regulada por una variedad de citocinas, tales como factores de crecimiento y mediadores inflamatorios, los cuales pueden incrementar o disminuir la síntesis de la enzima en una célula específica (Mauviel, 1993).

El otro nivel de regulación es la activación del zimógeno que puede alcanzarse por agentes sulfidrilo o con oxidantes u otras proteasas.

Los principales inhibidores fisiológicos de las MMP son una familia de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP).

Los principales inhibidores fisiológicos de las MMP son una familia de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), de los cuales se han identificado cuatro tipos diferentes de productos, denominados TIMP-1, 2, 3 y 4. Los TIMP forman complejos de alta afinidad con las formas activas de MMP e inhiben su actividad enzimática a través de una interacción no covalente (Pardo y Selman, 1996).

La participación de las MMP en procesos fisiológicos está bien documentada en procesos como la ovulación, la involución uterina, angiogénesis, remodelación ósea, etc. Las MMP participan, además, en la respuesta inflamatoria y desempeñan un papel importante en el desarrollo de numerosos procesos patológicos que incluyen la artritis reumatoide, invasión tumoral, enfermedades fibrosantes, enfisema y daño pulmonar agudo, entre otros (Selman y cols., 1996; Pardo y cols., 1996). En este contexto, un *incremento descontrolado* en la actividad de estas enzimas provoca destrucción tisular y esto es lo que se observa con el cartílago en la artritis reumatoide, el cual es degradado progresivamente por colagenasa intersticial. Una situación similar ocurre en el enfisema pulmonar, donde una actividad elastolítica y colagenolítica exageradas destruyen las paredes alveolares del pulmón. Por el contrario, las enfermedades fibrosantes, como la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar y la esclerosis sistémica progresiva, se acompañan de una *disminución anormal* en la actividad de estas enzimas, lo que favorece el depósito exagerado de moléculas de matriz, en especial de las colágenas intersticiales en los tejidos afectados.

Referencias bibliográficas

Babu, M.; Diegelmann, R. y Oliver, N., "Fibronectin is overproduced by keloid fibroblasts during wound healing", *Mol. Cell Biol.,* **9:** 1642-1650, 1989.

Bernfield, M.; Sanderson, R.D. y Syndecan, A., "Developmentally regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors", *Philos Trans. R. Soc. London Ser. B.,* **327:** 171-186, 1990.

Birk, D.E.; Fitch, J.M.; Babiarz, J.P.; Doane, K.J. y Linsemayer, T.F., "Collagen fibrillogenesis *in vitro*. Interaction of types I and V regulates fibril diameter", *J. Cell Sci.,* **95:** 649-657, 1990.

———; Fitch, J.M.; Babiarz, J.P. y Linsenmayer, T.F., "Collagen type I and V are present in the same fibril in the avian corneal stroma", *J. Cell Biol.,* **106:** 999-1008, 1989.

Boyd, C.D.; Toth-Fejel, S.E.; Gadi, I.K.; Litt, M.; Condon, M.R.; Kolbe, M.; Hagen, I.K.; Kurkinen, M.; Mackensie, J.W. y Magenis, E., "The genes coding for human pro aloha 1(IV) and pro alpha 2(IV) collagen are both located at the end of the long arm of chromosome 13", *Am. J. Hum. Genet.,* **42:** 309-314, 1988.

Bruckner-Tuderman, L.; Mitsuhashi, Y.; Schnyder, U.W., y Bruckner, P., "Anchoring fibrils and type VII collagen are absent from skin in severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa", *J. Invest. Dermatol.,* **93:** 3-9, 1989.

Burgeson, E.B. y Nimni, M.E., "Collagen Types. Molecular Structure and Tissue Distribution", *Clin. Orthopaed.,* **282:** 250-272, 1992.

Burgeson, R.E., "Type VII collagen", en *Structure and Function of Collagen types*, Mayne, R. y Burgeson, R.E., eds., Academic Press, Nueva York, 145-172, 1987.

Chung, A.E., *Laminin in Extracellular Matrix, Chemistry, Biology and Pathobiology with emphasis on the liver*, Zern, M.A. y Reid, L.M., eds., Marcel Dekker, Inc., 25-43, 1993.

——— y Durkin, M.E., "Entactin: Structure and Function", *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.,* **3:** 275-282, 1990.

Clearly, E.G. y Gibson, M.A., "Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins", *Int. Rev. Connect. Tissue Res.,* **10:** 97-209, 1983.

Collier, I.E.; Wilhem, S.M.; Eisen, A.Z.; Marmer, B.L.; Grant, G.A.; Seltzer, J.L.; Kromberger, A.M.; Bauer, E.A. y Goldberg, G.I., "H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading membrane collagen", J. Biol. Chem. **263:** 6579-6587, 1988.

Davidson, J.M. y Giro, M.G., "Control of elastin synthesis: molecular and cellular aspects", en *Regulation of matrix accumulation*, Mecham, R.P., ed., Academic Press, Nueva York, 178-216, 1986.

Dublet, B. y Van der Rest, M., "Type XIV collagen, a new homotrimeric molecule extracted from bovine skin and tendon, with type a triple helical disulfide-bonded domain homologous to type IX and type XII collagens", *J. Biol. Chem.,* **266:** 6853-6858, 1991.

Durkin, M.E.; Bartos, B.B.; Liu, S.H.; Phillips, S.L. y Chung, A.E., "Primary structure of the mouse laminin B2 chain and comparison with laminin B1", *Biochemistry,* **27:** 5198-5204, 1988.

———; Chakravarti, S.; Bartos, B.; Liu, H.; Friedman, L. y Chung, A.E., "Amino acid sequence and domain structure of entactin. Homology with epidermal growth factor precursor and low density lipoprotein receptor", **107:** 2749-2756, 1988.

Edge, A.B. y Spiro, R.G., "Characterization of novel sequences containing 3-O sulfated glucosamine in glomerular basement membrane heparan sulfate and localization of sulfated disaccharides to a peripheral domain", *J. Biol. Chem.,* **265:** 15874-15881, 1990.

Erickson, H.P., "Tenascin-C, Tenascin-R, and Tenascin-X, a family talented proteins in search of functions", *Curr. Opin. Cell Biol.,* **5:** 869-876, 1993.

——— y Bourdon, M.A., "Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors", *A. Rev. Cell Biol.,* **5:** 71-92, 1989.

Exposito, J.Y. y Garrone, R., "Characterization of a fibrillar collagen gene in sponges reveals the early evolutionary appearence of two collagen gene families", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **87:** 6669-6673, 1990.

Freije, J.M.P.; Díez-Itza, I.; Balbín, M.; Sánchez, L.M.; Blasco, R.; Tolivia, J. y López-Otín, C., "Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas", J. Biol. Chem. **269:** 16766-16773, 1994.

Gibson, M.A.; Kumaratilake, J.S. y Cleary, E.G., "The protein component of the 12-nanometer microfibrils of elastic and nonelastic tissues", *J. Biol. Chem.,* **264:** 4590-4598, 1989.

Godfrey, M. y Hollister, D.W., "Type II achondrogenesis-hypochondrogenesis: Identification of abnormal type II collagen", *Am. J. Hum. Genet.,* **43:** 904-906, 1988.

Goldberg, G.I.; Wilhem, S.M.; Kromberger, A.; Bauer, E.A.; Grant, G.A. y Eisen, A.Z., "Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation induced rat protein", *J. Biol. Chem.,* **261:** 6600-6605, 1986.

Gordon, M.K.; Gerecke, D.R.; Dublet, V.; Van der Rest, M.; Sugrue, S.P. y Olsen, B.R., "The structure of type XII collagen", *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* **580:** 8-16, 1990.

——— y Olsen, B.R., "The contribution of collagenous proteins to tissue-specific matrix assemblies", *Curr. Opin. Cell Biol.,* **2:** 833-838, 1990.

Gosline, J.M., "Hydrofobic interaction and a model for the elasticity of elastin", *Bioplymers,* **17:** 677-695, 1978.

Harrison, N.K. y Laurent, G.J., "Selected TopicsIn Lung Collagen Metabolism: The link between inflammation and Pulmonary Fibrosis", en *Interstitial Pulmonary Fibrosis,* Selman, M. y Barrios, R., eds., CRC Press Inc., Boca Ratón, Fl., 47-74, 1991.

Hasty, K.A.; Pourmotabbed, T.F.; Goldberg, G.I.; Thompson, J.P.; Spinella, D.G.; Stevens, R.M. y Mainardi, C.L., "Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases", *J. Biol. Chem.,* **265:** 11421-11424, 1990.

Heinegard, D. y Oldberg, A., "Structure and biology of cartilage and bone non-collagenous macromolecules", *FASEB J.,* **3:** 2042-2051, 1989.

Henkel, W. y Glanville, R.W., "Covalent crosslinking between molecules of type I and type III collagen", *Eur. J. Biochem.,* **122:** 205-213, 1982.

Hopkinson, S.B. y Jones, J.C.R., "Type XVII collagen and collagen-like molecules: Related by more than a common motif", *Seminars in Cell & Develop Biol.,* **7:** 659-666, 1996.

Hostikka, S.L.; Eddy, R.L.; Byers, M.G.; Hoyhtya, M.; Shows, T.B. y Trygvason, K., "Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **87:** 1606-1610, 1990.

Hunter, D.D.; Shah, V.; Merlie, J.P. y Sanes, J.R., "A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction", *Nature,* **338:** 229-234, 1989.

Indik, Z.; Yeh, H.; Ornstein-Goldstein, N. y Rosenbloom, J., "Structure of the elastin gene and alternative splicing of elastin mRNA", en *Genes for extracellular matrix proteins*, Sandell, L. y Boyd, C., eds., Academic Press, Nueva York, 221-250, 1990.

Iozzo, R.V. y Murdoch, A.D., "Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function", *FASEB J.,* **10:** 598-614, 1996.

Juul, S.W.; Wight, T.N. y Hascall, V.C., "Proteoglycans of the Lung", en *The Lung; Scientific foundations*, Crystal, R. y West, J., eds., Raven Press, Nueva York, **1:** 413-420, 1991.

Koch, M.; Wehrle, B.; Baumgartner, S.; Spring, J.; Brubacher, D. y Chiquet, M., "Epithelial synthesis of tenascin at tips of growing bronchi, and graded accumulation in basement membrane and mesenchyme", *Exp. Cell Res.,* **194:** 297-300, 1991.

Kornblihtt, A.R.; Pesce, C.G.; Alonso, C.R.; Cramer, P.; Srebrow, A.; Werbajh, S. y Muro, A.F., "The fibronectin gene as a model for slicing and transcription studies", *FASEB J.,* **10:** 248-257, 1996.

——— y Gutman, A., "Molecular biology of extracellular matrix proteins", *Biol. Rev.,* **63:** 465-507, 1988.

Lohmander, L.S.; Arnljots, K. y Yanagishita, M., "Structure and synthesis of intracellular proteoglycan in HL-60 human leukemic promyelocytes", *J. Biol. Chem.,* **262:** 5802-5808, 1990.

Matrisian, L.M., "The matrix degrading metalloproteinases", *BioEssays,* **14:** 455-463, 1992.

Matsumoto, K.I.; Arai, M.; Ishihara, M.; Ando, A.; Inoko, H. e Ikemura, T., "Cluster of fibronectin type III repeats found in the human major histocompatibility complex class III region shows the highest homology with the repeats in an extracellular matrix protein, tenascin", *Genomics,* **12:** 485-491, 1992.

Mauviel, A., "Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression", *J. of Cell Biochem.,* **53:** 288-295, 1993.

Mecham, R.P.; Hinek, A.; Entwistle, R.; Wrenn, D.S.; Griffin, G.L. y Senior, R.M., "Elastin binds to a multifunctional 67 kD peripheral membrane protein", *Biochemistry,* **28:** 3716-3722, 1989.

Mendler, M.; Eich-Bender, S.G.; Vaughan, L.; Winterhalter, K.H. y Bruckner, P., "Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI", *J. Cell Biol.,* **108:** 191-197, 1989.

Morris, N.P. y Bachinger, H.P., "Type XI collagen is a hetotrimer with the composition 1 alpha, 2 alpha, 3 alpha, retaining non-triple-helical domains", *J. Biol. Chem.,* **262:** 11345-11350, 1987.

Olsen, D.; Nagayoshi, T.; Fazio, M.; Peltonen, J.; Jaakola, S.; Sanborn, D.; Sasaki, T.; Kuivaniemi, H.; Chu, M.L.; Deutzman, R.; Timpl, R. y Uitto, J., "Human laminin: cloning and sequence analysis of cDNAs encoding A, B1 and B2 chains, and expression of the corresponding genes in human skin and cultured cells", *Lab. Invest.,* **60:** 772-782, 1989.

Pardo, A.; Selman, M.; Ridge, K.; Barrios, R. y Sznajder, J.I., "Increased expression of gelatinases and collagenase in rat lungs exposed to 100% oxygen", *Am. J. of Resp. Crit. Care Med.,* **154:** 1067-1075, 1996.

——— y Selman, M., "Matrix metalloproteinases and lung injury", *Braz. J. Med. Biol. Res.,* **29:** 1109-1115, 1996.

Patel, R.S.; Odermatt, E.; Schwartzbauer, J.E. y Hynes, R.O., "Organization of the fibronectin gene provides evidence for exon shuffling during evolution", *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **6:** 2565-2572, 1987.

Pihlajaniemi, T. y Tamminen, M., "The $\alpha 1$ chain of type XIII collagen consists of three collagenous and four noncollagenous domains, and its primary transcript undergoes complex alternative splicing", *J. Biol. Chem.,* **265:** 16922-16928, 1990.

Prockop, D.J.; Kivirikko, K.I.; Tuderman, L. y Guzmam, N.A., "The biosynthesis of collagen and its disorders", *N. Eng. J. Med.,* **310(9):** 13-23, 1979.

Pytela, R., Pierschbacher M.D. y Ruoslahti E.; "Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor", *Cell* **40(5):** 191-198, 1985.

Ramachandran, G.N. y Ramakrishnan, C.F., *Molecular structure*, en: Ramachandran, G.M. y Reddi, A.H., eds., Biochemistry of collagen, Nueva York, Plenum, 45-84, 1976.

Rathjen, F.G.; Wolff, J.M. y Chiquet-Ehrismann, R., "Restrictin: a chick neural extracellular matrix protein involved in cell attachment co-purifies with the cell recognition molecules F11", *Development,* **113:** 151-164, 1991.

Rehn, M. y Pihlajaniemi, T., "Type XV and XVIII collagens, a new subgroup within the family of collagens", *Seminars in Cell & Develop Biol.,* **7:** 673-679, 1996.

Risteli, L. y Risteli, J., "Noninvasive methods for detection of organ fibrosis", en *Focus of Connective Tissue in Health and Disease,* Rojkind, M., ed., CRC Press, Boca Ratón, Fl., 61-98, 1989.

Roberts, R.; Gallagher, J.; Spooncer, E.; Allen, T.D.; Bloomfield, F. y Dexter, T.M., "Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis", *Nature,* **332:** 376-378, 1988.

Rucker, R.B. y Dubick, M.A., "Elastin metabolism and chemistry: potential roles in lung development and structure", *Environ Health Perspect,* **53:** 179-191, 1984.

Ruoslahti, E., "Fibronectin and its receptors", *Annu. Rev. Biochem.,* **57:** 375-413, 1996.

———, "Structure and biology of proteoglycans", *Annu. Rev. Cell Biol.,* **4:** 229-255, 1988.

Sage, H. e Iruela-Arispe, M.L., "Type VIII collagen in murine development: Association with capillary formation *in vitro*", *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* **580:** 17-31, 1990.

Sasaki, M.; Kleinman, H.K.; Huber, H.; Deutzman, R. y Yamada, Y., "Laminin a multidomein protein: A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains", *J. Biol. Chem.,* **263:** 16536-16544, 1988.

Sato, H.; Takino, T.; Okada, Y.; Cao, J.; Shinagawa, A.; Yamamoto, E. y Seiki, M., "A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells", *Nature,* Londres, **370:** 61-65, 1994.

Schmitt, F.O., "Electron microscope investigations of the structure of collagen", *J. Cell Comp. Physiol.,* **20:** 11-33, 1942.

Selman, M.; Montaño, M.; Ramos, C.; Vanda, B.; Becerril, C.; Delgado, J.; Sansores, R.; Barrios, R. y Pardo, A., "Tobacco smoke-induced lung emphysema in guinea pigs is associated with increased interstitial collagenase", *Am. J. Physiol.,* **271** (*Lung. Cell Molec. Physiol.,* **15:** L734-L743, 1996.

Silbert, J., "Advances in the biochemistry of proteoglycans", en *Connective tissue disease: molecular pathology of the extracellular matrix*, Uitto, J., ed., Marcel Dekker Inc., Nueva York, 3-28, 1989.

Streuli, C.H.; Schmidhauser, C.; Bailey, N.; Yurchenco, P.; Skubitz, A.P.; Roskelley, C. y Bissell, M.J., "Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia", *J. Cell Biol.,* **129:** 591-603, 1995.

Timpl, R., "Structure and Biological activity of basement membrane proteins", *Eur. J. Biochem.,* **180:** 487-502, 1989.

——— y Engel, E., "Type VI collagen", en *Structure and Function of Collagen types*, Mayne, R. y Burgeson, R.E., eds., Academic Press, Nueva York, 105-140, 1987.

Van der Rest, M. y Mayne, R., "Type IX collagen", en *Structure and Function of collagen types*, Mayne, R. y Burgeson, R.E., eds., Academic Press, Nueva York, 195-219, 1987.

——— y Garrone, R., "Collagen Family of Proteins", *FASEB J.,* **5:** 2814-2823, 1991.

Vuorio, E. y De Crombrugghe, B., "The family of collagen genes", *Annu. Rev. Biochem.,* **59:** 837-872, 1990.

Wilhem, S.M.; Collier, I.E.; Marmer, B.L.; Eisen, A.Z.; Grant, G.A. y Goldberg, G.I., "SV40-transformed lung fibroblasts secrete a 92 kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal macrophages", *J. Biol. Chem.,* **264:** 17213-17221, 1989.

Wintergerst, E.S.; Fuss, B. y Bartsch, U., "Localization of janusin mRNA in the central nervous system of the developing and adult mouse", *Eur. J. Neurosci.,* **5:** 299-310, 1993.

Yamaguchi, N.; Benya, P.D.; Van der Rest, M. y Ninomiya, Y., "The clonning and sequencing of α 1(VIII) collagen cDNAs demonstrate that type VIII collagen is a short chain collagen and contains triple-helical domains similar to those to type X collagen", *J. Biol. Chem.,* **264:** 16022-16029, 1989.

Yurchenko, P.D. y Schittny, J.C., "Molecular architecture of basement membranes", *FASEB J.,* **4:** 1577-1590, 1990.

CAPÍTULO 18

MATRIZ EXTRACELULAR DE PLANTAS

Alejandra Covarrubias Robles ■ Gladys Iliana Cassab López



Introducción

Para la célula vegetal, la pared celular o matriz extracelular (MEC) es una zona limítrofe, en donde la célula contacta con el mundo exterior. En los últimos años, el concepto de pared celular se ha modificado y ha dejado de considerarse como el muro constrictor de la célula para convertirse en un organelo con una alta complejidad estructural y ejecutor de una gran diversidad de funciones durante la vida de una planta.

> Para la célula vegetal, la pared celular o matriz extracelular (MEC) es una zona limítrofe, en donde la célula contacta con el mundo exterior.

Aunque la MEC vegetal posee características funcionales similares a las de los animales (capítulo 19), sin embargo, presenta algunas otras, muy particulares, que han evolucionado de acuerdo a las necesidades adaptativas de las plantas. Así, por ejemplo, a diferencia de las células animales, en las plantas cada célula está rodeada por una pared celular. Ésta se origina durante la duplicación celular o citocinesis mediante la inserción de una partición, la placa celular, y no por la separación de protoplastos como ocurre en las células animales. La placa celular es el resultado de la fusión de vesículas de Golgi al centro de la figura mitótica (figura 18-1), de tal forma que al finalizar este proceso las células no sólo comparten una misma pared, sino que no se llegan a separar por completo, ya que algunas vesículas de Golgi no se llegan a fusionar con la membrana. Estas conexiones protoplásmicas llegan a formar estructuras diferenciadas, conocidas como plasmodesmas, que llevan a cabo funciones especializadas de comunicación intercelular. Así pues, a nivel microscópico, las plantas aparentan un sincitio por la presencia de un continuo protoplásmico en todas sus células.

> La MEC vegetal posee características funcionales similares a las de los animales.

> Las conexiones protoplásmicas entre células vegetales se conocen como plasmodesmas.

Los primeros estudios de la pared celular llevaron a la conclusión de que una célula vegetal era capaz de mantener una forma determinada y soportar grandes presiones gracias a la rigidez de su pared celular. Debido a esta notable rigidez, una planta es capaz de llegar a tener grandes tamaños y una gran dureza (Taiz, 1984). Sin embargo, la pared celular realiza funciones que van más allá de proporcionar dureza y mantener una forma definida. Su participación en los procesos de crecimiento y desarrollo de una planta es de suma relevancia y es una muestra de su dinamismo.

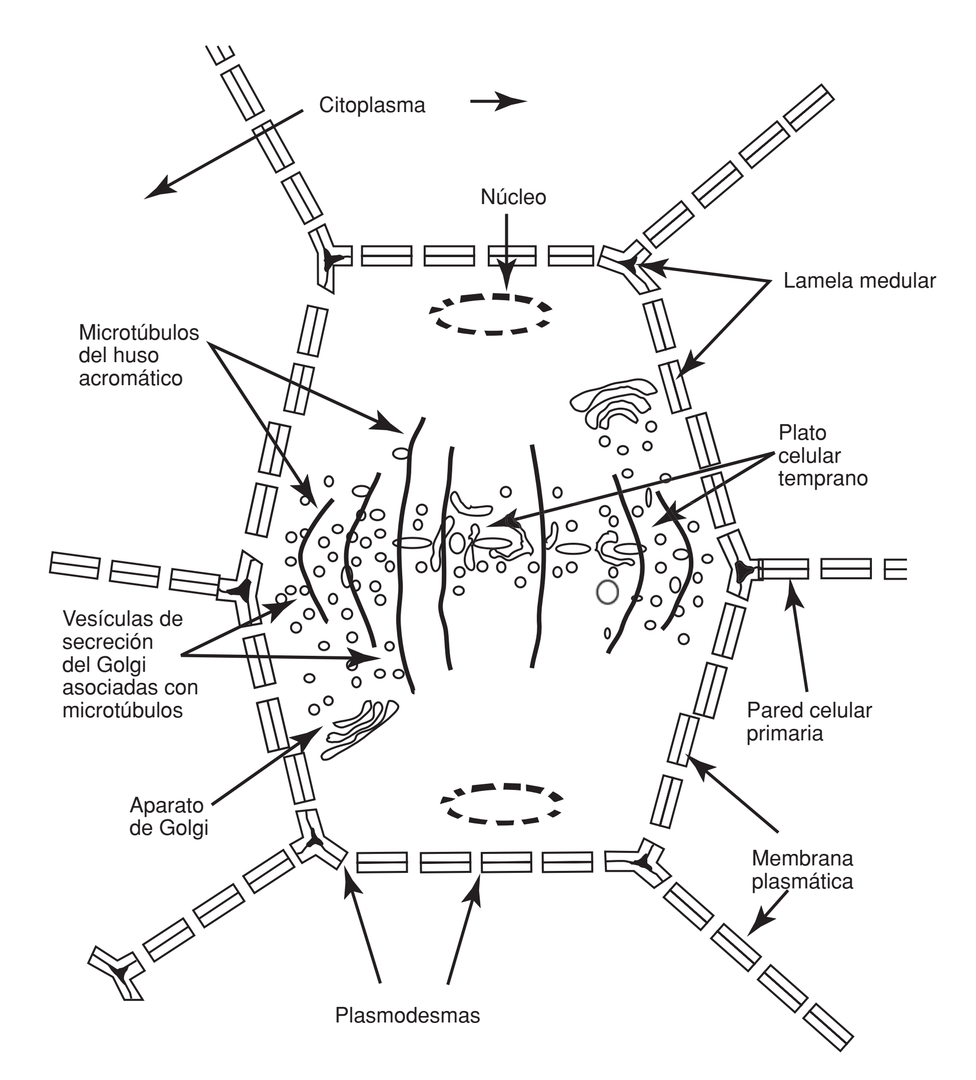


Figura 18-1. Citocinesis en las células vegetales. Formación del plato celular después de la mitosis. (Adaptada de Kaplan y Hageman, 1991.)

La MEC de plantas está constituida por celulosa, hemicelulosa, pectinas, lignina, suberina, proteínas estructurales, enzimas y agua.

La MEC de plantas está constituida por celulosa, hemicelulosa, pectinas, lignina, suberina, proteínas estructurales, enzimas y agua. Quizás cientos o miles de genes se requieran para producir una pared celular. A la fecha, sabemos muy poco sobre el proceso de síntesis y secreción de los componentes de la pared. Aún menos sobre cómo se lleva a cabo el ensamblaje de estos componentes en una pared celular en crecimiento. Se puede suponer que la adición de componentes no celulósicos a la pared existente se realiza enteramene por autoensamblaje, si cada componente estuviera diseñado para encajar apropiadamente con otros. Las microfibrillas de celulosa se colocan por aposición sobre la superficie interna de la pared previamente formada. Los componentes de la matriz —hemicelulosas, pectinas y proteínas— se añaden por interposición en cualquier lugar de la pared existente. La pared que se sintetiza mientras la célula incrementa su volumen es la pared primaria. La celulosa y la calosa se sintetizan en la membrana plasmática. Los

polisacáridos no celulósicos se sintetizan en el aparato de Golgi, se empacan en vesículas secretoras y se exportan a la superficie donde se integran con las microfibrillas de celulosa. Las capas de pared que se colocan cuando la célula ha dejado de crecer comprenden la pared secundaria.

Con la finalidad de exponer una visión integral y dinámica de la MEC vegetal, esta revisión estará enfocada hacia la participación de la MEC en diferentes procesos vitales para una planta. La primera parte de este capítulo se refiere a la composición y estructura de la MEC, con la idea de hacer más comprensible la segunda parte, en donde se describen las funciones de la matriz en procesos tales como el crecimiento celular, la diferenciación y morfogénesis y la respuesta a estímulos ambientales.



Principales componentes de la matriz extracelular

Polisacáridos

Las microfibrillas de celulosa en una pared primaria son elípticas en cortes transversales con ejes de 50 a 300 Å, constituyen de 20 a 30% del peso seco de la pared y ocupan 15% de su volumen. Las microfibrillas se forman por la asociación de moléculas individuales de celulosa (β-1,4- unido a D-glucanos) en arreglos cristalinos casi libres de agua. Aunque el aparato enzimático para la síntesis de celulosa no se conoce con exactitud, aparentemente está contenido en partículas observadas por microscopia electrónica como grupos ordenados en rosetas —"complejos terminales"— en el plasmalema y que están asociados con el ensamblaje de las microfibrillas (Brown y cols., 1996). Las moléculas de celulosa producidas por las rosetas se agregan con rosetas adyacentes para formar las microfibrillas. La orientación de las microfibrillas está determinada por los microtúbulos y es generalmente transversal al eje principal de crecimiento; sin embargo, en algunas paredes primarias se alternan capas de microfibrillas con ángulos rectos entre ellas. Mientras la célula incrementa su longitud, las microfibrillas en las capas externas de la pared pueden estirarse y presentar una orientación casi paralela al eje de elongación. Recientemente, Delmer y Amor. han comunicado la clonación del gen de la celulosa-sintetasa de algodón (gen *celA*, Carpita y cols., 1996). Este gen presenta secuencias consenso de unión a UDP-Glc y varios dominios con más de 50% de similitud con genes de celulosa-sintetasa de bacterias. Además, se expresa fuertemente en fibras de algodón cuando comienzan a producir pared secundaria y se expresa muy poco en raíces, flores o semillas. Aunque se ha identificado el candidato catalítico de la celulosa-sintetasa, los diferentes componentes proteicos que forman las rosetas, los arreglos hexagonales que extruden microfibrillas de celulosa (Brown y cols., 1996), aún no se han encontrado. El hecho de que la sacarosa-sintetasa esté asociada con la membrana plasmática sugiere que podría ser parte del complejo de rosetas y así suplir de UDP-Glc directamente a la celulosa-sintetasa.

> Las microfibrillas se forman por la asociación de moléculas individuales de celulosa.

Los xiloglucanos son parte de la hemicelulosa y llegan a formar 20% del peso seco de la pared primaria de plantas dicotiledóneas y sólo 2% de las

monocotiledóneas. Los xiloglucanos son polisacáridos estructurales que contribuyen a la arquitectura de la pared celular primaria. Tienen un esqueleto de residuos D-glucosídicos unidos en enlace β-4 con cadenas laterales de D-xilosil unidos con enlace tipo-α-4 al grupo *O*-6 de algunos de los residuos glucosídicos. Algunas cadenas laterales de residuos xilosil tienen D-galactosil o L-fucosil-2-α-D-galactosil con enlace tipo-β al grupo *O*-2 de los residuos xilosil (McNeil y cols., 1984). Se ha demostrado tanto por técnicas de extracción como por inmunocitoquímica que los xiloglucanos se encuentran fuertemente entrecruzados con celulosa mediante puentes de hidrógeno (McNeil y cols., 1984; Moore y Staehelin, 1988; Hayashi y cols., 1987). También, los xiloglucanos purificados se asocian fuertemente *in vitro* con microfibrillas de celulosa purificadas y entre ellos no se asocian (Hayashi y cols., 1987). Dadas estas propiedades, los xiloglucanos parecen formar, *in muro,* una capa sobre la superficie de la región cristalina de las microfibrillas y penetrar en las regiones amorfas. Las moléculas de xiloglucanos parecen mediar un fuerte enlace de las microfibrillas en el gel de la MEC. *In vivo*, se forman trazas de oligosacáridos mediante la ruptura parcial de xiloglucanos, por hidrolasas y/o endotransglicolasas. Algunos de estos oligosacáridos tienen efectos muy similares a hormonas y se conocen como oligosacarinas (Fry, 1996). La elongación de las paredes celulares del epicótilo de chícharo inducida por auxinas está acompañada por la liberación de fragmentos de xiloglucanos y un incremento en la actividad de la glucanasa-endo-β-1,4 que corta a estos polisacáridos. Oligosacarinas en concentraciones nanomolares inhiben el crecimiento de tallos de chícharos inducidos por auxinas y giberelinas.

Los xilanos son el componente hemicelulósico más abundante de las paredes de las monocotiledóneas.

Los xilanos son el componente hemicelulósico más abundante de las paredes de las monocotiledóneas (15 a 20% del peso seco de la pared) y un componente minoritario (2%) de las paredes de las dicotiledóneas. Todos los xilanos tienen esqueletos de residuos xilosil unidos con enlace tipo β-4. Los diferentes tipos de xilanos presentan diferentes combinaciones de cadenas laterales unidos a los residuos xilosil al *O*-2 o al *O*-3. Éstos incluyen L-arabinofuranosil, D-galactosil-β-5-L-arabinofuranosil, D-xilosil-β-2-L-arabinofuranosil, D-galactosil-β-4-L-xilosil-b-2-L-arabinofuranosil y residuos D-glucoronosil. Los xilanos también se unen fuertemente a microfibrillas de celulosa por puentes de hidrógeno con una fuerza de unión inversamente proporcional al grado de sustitución por cadenas laterales.

Los glucanos tipo β son polisacáridos que contienen una mezcla de residuos D-glucopiranosil unidos con enlace tipo β-3 (30%) y β-4 (70%) y forman parte de las hemicelulosas características de las paredes celulares de las gramíneas. Aparentemente, las uniones tipo β-3 raramente se encuentran contiguas, mientras que las tipo β-4 se encuentran seguidas en corridas de dos o tres, y con corridas ocasionales de hasta 10 residuos.

Las paredes celulares primarias contienen pequeñas cantidades de polisacáridos neutrales que son esencialmente arabinanos, galactanos y arabinogalactanos puros.

Las paredes celulares primarias contienen pequeñas cantidades de polisacáridos neutrales que son esencialmente arabinanos, galactanos y arabinogalactanos puros. Los arabinanos están unidos principalmente a residuos α-L-arabinofuranosil con enlace tipo 5 con residuos α-L-arabinofuranosil unidos al *O*-2 y/o *O*-3 de las unidades de arabinosil del esqueleto. Los galac-

tanos son esencialmente galactanos puros unidos con enlaces β-4. Los arabinogalactanos son mucho más complejos y no están bien caracterizados.

Los homogalacturonanos, junto con los ramnogalacturonanos I y II, comprenden las pectinas de dicotiledóneas. Los homogalacturonanos están hechos enteramente por residuos de ácido galacturónico unido con enlaces α-4. El grado preciso de polimerización de los homogalacturonanos *in muro* se desconoce, así como su frecuencia y patrón de interrupciones de los residuos de galacturonato con otros azúcares. El polímero se secreta aparentemente con la mayoría de los grupos uronato esterificados con grupos metilo.

El ramnogalacturonano I (RG-I) de las paredes de células en suspensión de maple tiene un grado de polimerización de cerca de 2000. Éste consta de un esqueleto de residuos de L-ramnosil unidos a la posición 1, alternados con ácido D-galacturónico unido a la posición 4. Cerca de la mitad de los residuos ramnosil están glicosilados en la posición *O*-4 con cadenas de siete residuos glicosil. Hay al menos 30 clases diferentes de estas cadenas laterales y son ricas en residuos de arabinosil y galactosil. Aparentemente, las monocotiledóneas contienen componentes similares a RG-I, pero éstos no han sido aún caracterizados.

El ramnogalacturonano II (RG-II) es una molécula muy diferente. Consta de cerca de 60 residuos glicosil, está covalentemente pegado a otros componentes de la pared a través de una serie de residuos de ácido galacturónico unido con enlaces α-4, y contiene varios residuos glicosil poco frecuentes, incluyendo al 2-*O*-metilfucosil, 2-*O*-metilxilosil, apiosil, 3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilosil y ácido 3-deoxi-mano-octulosónico (McNeil y cols., 1984). La función de RG-II se desconoce. Sin embargo, el descubrimiento de que RG-II contiene ésteres de boro (Kobayashi y cols., 1996) apoya la hipótesis de que se requieren polisacáridos pécticos que contienen boro para el crecimiento y desarrollo normal de plantas (Loomis y Durst, 1992; Hu y Brown, 1994). El boro (B) es un microelemento esencial para el crecimiento de las plantas, aunque su función no ha sido aún determinada. La deficiencia en B resulta aparente primeramente en tejidos en crecimiento y es evidente, no sólo por sus efectos sobre la expansión celular, la cual se lleva a cabo de manera desorganizada, sino también por la formación de paredes celulares con morfología anormal (Loomis y Durst, 1992). Se supone que el B forma ésteres diolborato que se entrecruzan covalentemente con polisacáridos pécticos de la pared celular. Aparentemente, el grado de requerimiento de B en plantas está determinado en gran parte por el contenido de RG-II en sus paredes celulares. De ahí que las dicotiledóneas y las monocotiledóneas que no son gramíneas tengan un alto requerimiento de B, en comparación con las gramíneas, ya que en estas últimas el contenido de pectina es tres veces menor.

Hasta hace poco tiempo, se reconocían tres clases de pectinas: homogalacturonanos, RG-I y RG-II. Sin embargo, Mort y cols. (Carpita y cols., 1996) aislaron recientemente una nueva clase de pectinas, los xilogalacturonanos. Al igual que el RG-II, los xilogalacturonanos tienen esqueletos de homogalacturonanos, pero con grupos terminales no reductores de unidades de xil pegadas a la posición *O*-3 de aproximadamente la mitad de las unidades de Gal.

Las paredes celulares de *Pseudotsuga menziesii*, una gimnosperma, son más similares a las paredes de dicotiledóneas que a las de las gramíneas, en que éstas tienen predominancia de xiloglucanos sobre xilanos como la hemicelulosa principal y además poseen relativamente grandes cantidades de pectinas tipo ramnogalacturonano.

Se han utilizado anticuerpos monoclonales contra diferentes epítopos de carbohidratos presentes en la pared celular para localizarlos en raíces en desarrollo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Freshour y cols., 1996). Un epítopo de la pectina RG-I se observa en las paredes de las células epidérmicas y corticales de partes maduras de la raíz. Este epítopo se inserta en las paredes de una manera regulada por el desarrollo. Inicialmente, el epítopo se observa en atricoblastos (células epidermales que no forman pelos radiculares) y luego aparece en tricoblastos (células epidermales formadoras de pelos radiculares) y simultáneamente en células corticales. Un epítopo contra α-fucosil terminal está presente en casi todas las paredes celulares de la raíz. Un epítopo contra un β-galactán-arabinosilado se localiza en todas las paredes celulares de la raíz con la excepción de las paredes celulares laterales de la cofia. Resulta muy interesante que estos tres epítopos no estén distribuidos uniformemente (o accesibles) dentro de las paredes de una célula dada y que no estén distribuidos igualmente a través de las dos paredes presentes entre células adyacentes (Freshour y cols., 1996).

La MEC de plantas comienza a depositarse durante la fusión de las vesículas derivadas del aparato de Golgi que se han colocado en la placa celular en desarrollo.

La MEC de plantas comienza a depositarse durante la fusión de las vesículas derivadas del aparato de Golgi que se han colocado en la placa celular en desarrollo. En *Arabidopsis*, estas vesículas están marcadas con dos de los epítopos (α-fucosil terminal y β-galactán-arabinosilado), lo cual confirma que los xiloglucanos y RG-I y/o proteínas de arabinogalactano son de los primeros componentes que se depositan en la nueva pared sintetizada (Freshour y cols., 1996). Los xiloglucanos y arabinogalactanos se sintetizan en el aparato de Golgi. El hecho de que la citocinesis resulte en la síntesis de una pared nueva en cada una de las células hijas sugiere un mecanismo por el cual la célula puede controlar y alterar selectivamente las características estructurales de una de las paredes que la rodea.

El crecimiento mayor de las paredes periclinales y anticlinales orientadas longitudinalmente en comparación con las paredes anticlinales transversales demuestra que la célula vegetal selecciona individualmente los precursores de su pared y los dirige a las diferentes paredes que la rodean. La presencia de cutina en las paredes externas de las células epidermales y la banda de Caspari en las paredes radiales de las células endodermales, también establecen el principio de síntesis asimétrica de las diferentes paredes de una célula en particular. Se ha propuesto la hipótesis de que varios tipos de aparato de Golgi producen diferentes poblaciones de vesículas secretoras que acarrean diferentes combinaciones de carbohidratos complejos dirigidos a diferentes paredes de la célula.

La MEC depositada durante la citocinesis rápidamente se diferencia en dos paredes celulares cuando se añaden componentes adicionales a la matriz por cada una de las células hijas. Estos componentes sintetizados recientemente incluyen polisacáridos tales como calosa y celulosa, que se sintetizan en la membrana plasmática después de que se fusionan las vesículas en la

placa celular. Componentes adicionales sintetizados en el aparato de Golgi (por ejemplo, xiloglucanos, pectinas, arabinogalactanos) también continúan añadiéndose después de la citocinesis. Por lo tanto, existe diferenciación poscitocinética de la pared, la cual se regula cuidadosamente. Esta diferenciación se refleja en las diferentes características estructurales de las paredes de los distintos tipos de células en diferentes estadios de desarrollo.



Proteínas estructurales de la matriz extracelular

En la MEC se han identificado hasta la fecha varias clases de proteínas.

En la MEC se han identificado hasta la fecha varias clases de proteínas. Estas proteínas, enlistadas en la tabla 18-1, incluyen a las extensinas (glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, HRGP), las proteínas ricas en glicina (GRP), las proteínas ricas en prolina (PRP), y las proteínas de arabinogalactano (AGP). Todas ellas podrían estar claramente relacionadas evolutivamente, ya que casi todas contienen, con la excepción de las GRP, hidroxiprolina. No obstante, información reciente indica que las designaciones ricas en prolina, ricas en hidroxiprolina y ricas en glicina serían más aplicables a dominios dentro de las proteínas que a las proteínas mismas. Por ejemplo, una proteína aislada de cultivos en suspensión de zanahoria a pesar de reaccionar con el agente de Yariv como todas las AGP (ver más adelante), no contiene hidroxiprolina (Hyp). Ésta contiene un mosaico de dominios peptídicos ricos en Pro, Cys e His y tiene homología con una PRP (Roberts, en Carpita y cols., 1996). Aunque su función no es muy clara, el dominio rico en His parece estar implicado en su unión con pectinas.

Aunque estas proteínas no son las únicas que se localizan en la MEC, se consideran las más abundantes y las mejor caracterizadas. Otras como las tioninas ricas en cisteína y las proteínas de 33 y 36 kDa reguladas por estrés osmótico (Covarrubias y cols., 1995), la elusina que es una posible proteína de pared con un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico de cinasas de serina/treonina (Kohorn y cols., en Carpita y cols. 1996) han sido también localizadas en la MEC.

Extensinas

Estructura

Las extensinas son las proteínas más abundantes y mejor caracterizadas de las paredes celulares de plantas dicotiledóneas.

Las extensinas son las proteínas más abundantes y mejor caracterizadas de las paredes celulares de plantas dicotiledóneas (Cassab y Varner, 1988; Varner y Lin, 1989; Showalter, 1993; Kieliszewski y Lamport, 1994). En plantas monocotiledóneas las extensinas no son tan abundantes, pero varios tipos de ellas han sido caracterizadas (Kieliszewski y Lamport, 1994). Éstas tienen las siguientes características: 1) son proteínas básicas (con puntos isoeléctricos de ~10) por su alto contenido en Lys; 2) son ricas en Hyp que típicamente están glicosiladas con uno a cuatro residuos de arabinosa;

Tabla 18.1. Principales clases de proteínas estructurales de la pared celular.

Clase	%proteína	%CHO[a]	aa[b]	[a]abundantes	Dominios
Extensinas	~45	~55	O, S, K, Y, V, H	SOOOOSOSOOOOYYYK (dicotiledóneas)	SOOOK
					SOOOOTOVKY
					SOOOOVYKYK
Extensinas	~70	~30	O, T, S, P, K	TPKPTOOTYTOSOKPO	
(monocotiledóneas)				ATKPP	
Extensinas	~25-50	~50-75	O, S	PPP y PP	
(*Chlamydomonas*)					
Extensinas	~30	~70	O, S	$S(O)_{3-7}$	
(*Volvox*)					
PRP		80-100	0-20	O, P, V, Y, K	PPVYK y PPVEK
PRP		?[c]	?	O, P, E, H, K	PPHEK y PPPEYQ
(nodulinas)					
GRP		?	?	G	GX
(dicotiledóneas)					
GRP		?	?	G	GG y GGY
(monocotiledóneas)					
AGP		2-10	90-98	O, S, A, T, G	AO

[a] CHO = carbohidrato
[b] aa = aminoácido; O = hidroxiprolina
[c] ? = desconocido

3) tienen secuencias repetidas; 4) generalmente asumen estructura de hélice de poliprolina II y aparecen como varillas flexibles en el microscopio electrónico, y 5) las cadenas laterales de Ser, Thr, Hyp, Lys, Tyr y His ofrecen varias oportunidades para modificaciones postraduccionales e interacciones *in muro* en la pared celular.

Históricamente la primera secuencia repetida, Ser-Hyp_4, se presentaba en todos los péptidos de extensina aislados de tomate (Smith y cols., 1986), maple y tabaco, y se infería a partir de clonas de zanahoria, petunia, tabaco, frijol y girasol (Showalter, 1993). Por su ubicuidad, ciertamente dentro de las dicotiledóneas avanzadas, la secuencia Ser-Hyp_4 se consideró el marcador por excelencia de las extensinas. Sin embargo, la extensina de betabel (una dicotiledónea primitiva) no contiene bloques de tetra-Hyp, pero sí es homóloga a las extensinas tipo P1 que contienen la secuencia Ser-Hyp-Hyp-Hyp-Hyp-Val-Lys-Pro-Tyr-His-Pro-Thr-Hyp-Val-Thr-Lys (Li y cols., 1993).

En monocotiledóneas, se presentan diversas versiones de extensinas. Por ejemplo, en maíz están presentes tanto la glicoproteína rica en Thr e Hyp (THRGP) como la glicoproteína rica en His e Hyp (HHRGP) que también es rica en Ala (Kieliszewski y cols., 1990). La THRGP está bastante bien caracterizada tanto a nivel de la proteína (Kieliszewski y cols., 1990) como del gen (Stiefel y cols., 1990). Estos estudios muestran que la THRGP es distinta de las típicas extensinas de dicotiledóneas, ya que es rica en Thr y Pro, además de Hyp, Lys y Ser; y contiene dos estructuras novedosas de aminoácidos: Thr-Pro-Lys-Pro-Thr-Hyp-Hyp-Thr-Tyr-Thr-Hyp-Ser-Hyp-

Lys-Pro-Hyp y Ala-Thr-Ser-Lys-Pro-Pro y únicamente una secuencia de Ser-Hyp_4; los residuos de Ser y aproximadamente la mitad de los de Hyp no están glicosilados; y la proteína parece existir en la conformación de *random coil* y no en la hélice de poliprolina II. Recientemente, se ha clonado otra HRGP de maíz que específicamente se expresa en polen. Esta clona de cDNA especifica varias secuencias repetidas de Lys-Ser-Ser/Pro-Pro_3-Ala-Pro-X-Ser_2-Pro_4-X, en la que la X representa algún aminoácido hidrofóbico (Rubinstein y cols., 1995).

Las gimnospermas también presentan HRGP. De células en suspensión de encino se han aislado dos HRGP diferentes. Una de estas HRGP tiene secuencias características muy similares a las PRP (Kieliszewski y cols., 1992), mientras que la otra contiene unidades repetidas de Ser-Hyp_4 y Ala-Hyp (Fong y cols., 1992) que son características de extensinas y AGP, respectivamente. De hecho, esta última HRGP resulta muy interesante, ya que parece eliminar la distinción entre extensinas y AGP, e indica un posible movimiento de dominios repetitivos durante la evolución de estas glicoproteínas de la MEC. Bao y cols. (1992) también encontraron que la madera de un pino contiene una HRGP en la pared celular con 24% de Pro y 11% de Hyp, pero no se cuenta con secuencias de esta proteína.

Las algas verdes como *Chlamydomonas* y *Volvox* parecen tener otras versiones de HRGP. Por ejemplo, en *Chlamydomonas* se presentan al menos dos grupos de HRGP (Adair y Snell, 1990). Un grupo está distribuido característicamente en las paredes celulares de células vegetativas y gaméticas, mientras que el otro se encuentra localizado en las paredes celulares de células cigóticas. La HRGP de cigotos ha sido clonada y contiene dominios de secuencias con $(Pro)_3$ y $(Ser\text{-}Pro)_n$ (Woesner y Goodenough, 1989), mientras que las células vegetativas contienen HRGP con secuencias repetidas de $(Pro)_3$, Pro-X-Pro, Pro-X-X-Pro y Leu-Pro. Además, las aglutininas más y menos de *Chlamydomonas* que atraen a gametos de sexos opuestos durante la reproducción sexual, son HRGP similares a las HRGP vegetativas. La secuencia Leu-Leu-Hyp-Hyp se encuentra presente en ambas aglutininas sexuales y en la HRGP vegetativa (Adair y Snell, 1990). En *Volvox*, se expresa una novedosa HRGP sulfatada que consiste de un dominio globular y un dominio en forma de varilla durante la inversión embrionaria. Esta glicoproteína ya ha sido clonada y su dominio en forma de varilla consta de numerosas unidades repetidas de Ser-$Hyp_{3\text{-}7}$ (Ertl y cols., 1992).

Las relaciones evolutivas entre las diferentes extensinas se han examinado a nivel de secuencia de DNA y proteína y se han construido árboles filogenéticos (Kieliszewski y Lamport, 1994; Ahn y cols., 1996). Aparentemente las HRGP de plantas dicotiledóneas forman tres grupos separados con la excepción de cinco HRGPs. Los grupos I y III son los grupos principales de HRGP de dicotiledóneas, con la secuencia consenso de Ser-Pro_4-Thr-Pro-Val-Tyr-Lys, Ser-Pro_4-(X)-Thr-Pro-Val-Tyr-Lys (en donde [X] es, por lo general, la secuencia de inserción Lys_2-Pro-Tyr_2-Pro-His) y/o Ser-Pro_4-Ser-Pro-Ser-Pro_4-Tyr-Tyr/Val-Tyr-Lys, respectivamente. La característica distintiva del grupo I es la secuencia Thr-Pro-Val-Tyr-Lys y la del grupo III

los bloques ricos en Tyr-Tyr-Tyr/Val-Tyr-Lys después del pentapéptido canónico Ser-Pro_4, con o sin la secuencia de inserción. Aunque las HRGP que pertenecen al grupo I y II contienen un solo dominio, las del grupo II contienen dos dominios diferentes. Dentro de las HRGP del grupo II, hay dos subformas que son más similares al grupo I o al grupo III, respectivamente.

Regulación de la expresión genética

Existen varias condiciones y tratamientos, enlistados en la tabla 18-2, que, por lo general, incrementan la expresión de extensinas. Sin embargo, en sólo un tratamiento se ha observado una disminución en la expresión de extensina en nódulos cuando se cultivan plantas de frijol en ausencia de boro (Dantan y Cassab, datos no publicados). Probablemente, en estos cambios está involucrada la activación de genes, aunque solamente en frijol se ha verificado la regulación transcripcional en respuesta a heridas, infección por hongos, elicitores de hongos y glutatión (Wingate y cols., 1988). En zanahoria, se han identificado factores de transcripción que interactúan con elementos del promotor del gen para extensina en respuesta a heridas y a etileno (Holdsworth y Laties, 1989a y b; Granell y cols., 1992).

Tabla 18.2. Condiciones que regulan la expresión de las principales clases de proteínas estructurales de pared celular.

Clase	Condiciones
Extensinas (dicotiledóneas)	Heridas, infección por hongos, por virus, elicitores endógenos y de hongos, etileno, luz roja, estrés por calor, gravedad, glutatión, cultivo de tejidos, desarrollo
Extensinas (monocotiledóneas)	Desarrollo, heridas
Extensinas (*Chlamydomonas*)	Desarrollo
Extensinas (*Volvox*)	Desarrollo
PRP	Heridas, elicitores endógenos y de hongos, etileno, cultivo de luz, roja, desarrollo
PRP (nodulinas)	Desarrollo
GRP (dicotiledóneas)	Desarrollo, infección viral, ácido salicílico, ácido abscísico, estrés por sequía, heridas
GRP (monocotiledóneas)	Desarrollo, estrés por sequía, ácido abscísico, mercurio, heridas
AGP	Desarrollo, heridas

Los intentos por localizar las extensinas a nivel tisular no sólo introdujeron metodologías nuevas sino que también han arrojado datos interesantes. Los métodos de impresión de tejidos tipo Northern y Western han permiti-

do localizar la extensina, y su correspondiente transcrito, en varias plantas y tejidos. Estos estudios simples y a la vez elegantes han complementado estudios mucho más sofisticados que utilizan la hibridización *in situ* y la inmunolocalización. En general, estos estudios muestran que la expresión génica y localización de las extensinas varía de planta a planta y entre tipos de tejido y de célula, probablemente de acuerdo con las diferentes funciones de los diversos tejidos y tipos celulares. Las extensinas están asociadas comúnmente con el floema y *cambium*, pero también pueden estar asociadas con otras clases de tejidos como el esclerénquima donde forman 40% del peso seco de la pared celular (Cassab y Varner, 1987). Aunque la técnica de impresión de tejidos es simple y poderosa, está limitada por la eficiencia de la transferencia de proteína o mRNA de las células a la membrana. Esto se debe a que la gran mayoría de las extensinas se entrecruzan extensivamente en la pared y, por lo tanto, se insolubilizan, de ahí que no puedan ser detectadas en las impresiones de tejidos. Otro problema, que además debe considerarse al analizar impresiones de tejidos tipo Northern o Western, hibridizaciones *in situ* e inmulocalizaciones, es la posibilidad de que las sondas de ácidos nucleicos y anticuerpos se entrecruzan con otras secuencias o secuencias relacionadas con extensinas (ver más adelante).

Interacciones intermoleculares y funciones

La rápida insolubilización de las extensinas, una vez que son secretadas a la pared, además de representar una limitante durante su estudio, también obliga a la pregunta de cuál es el mecanismo por el que ocurre dicha insolubilización, así como la naturaleza de las moléculas con las que interactúa en la pared. Hasta la fecha, hay varias pistas, pero ninguna evidencia directa. Las extensinas pudieran entrecruzarse mediante enlaces intermoleculares tipo difeniléter entre tirosinas, aunque dichos enlaces solamente han sido encontrados a nivel intramolecular (Epstein y Lamport, 1984). Sin embargo, otro tipo de entrecruzamientos podrían también estar presente. Se ha mostrado que monómeros de extensina (extensina soluble) forma oligómeros en presencia de un extracto crudo de pared (Everdeen y cols., 1988). Otros estudios revelan que la insolubilización de extensina y PRP se induce a los pocos minutos de agregar elicitores, heridas o tratamiento con glutatión (Bradley y cols., 1992). Se ha propuesto la hipótesis de que este proceso de insolubilización está mediado por la liberación de peróxido de hidrógeno y catalizado por una peroxidasa de pared. Esta respuesta aparenta ser una defensa ultrarrápida.

Las extensinas también podrían estar entrecruzadas con algunos carbohidratos. Esta idea fue sugerida hace algunos años (Keegstra y cols., 1973); pero hasta hace poco se encontró la existencia de este tipo de entrecruzamiento entre pectinas y extensinas (Qi y cols., 1995). Además, las extensinas podrían interactuar iónicamente con las pectinas. Los residuos positivos de Lys y protonados de His son candidatos para formar interacciones iónicas con los ácidos urónicos, cargados negativamente, de las pectinas. Dichas interacciones podrían estar reguladas por cambios de pH, y/o por los niveles

Las extensinas también podrían estar entrecruzadas con algunos carbohidratos.

de boro y Ca^{2+} en la pared que alterarían sus propiedades fisicoquímicas. Los residuos de lisina también podrían formar uniones de bases de Schiff con polisacáridos, y estos enlaces podrían alterarse reversiblemente por cambios en el pH de la pared (Varner y Lin, 1989).

Aunque las propiedades estructurales y regulatorias proporcionan pistas sobre las posibles funciones de las extensinas, no se cuenta con evidencia directa sobre éstas. Por lo pronto, se ha propuesto que las extensinas son proteínas estructurales que también pueden funcionar durante el desarrollo, cicatrización de heridas y mecanismos de defensa. En el caso de desarrollo, las extensinas parecen estar involucradas en la morfogénesis del esclerénquima de la testa de leguminosas (Cassab y Varner, 1987), así como también en el crecimiento del tubo polínico durante la polinización en maíz (Rubinstein y cols., 1995). En cuanto a heridas y mecanismos de defensa, el incremento en el depósito de extensina, así como de su entrecruzamiento, debería producir una pared celular más impenetrable que impediría la infección por patógenos. Evidencia indirecta sobre esta idea proviene de la observación de que las paredes celulares de células en cultivo de frijol tratadas con elicitores, las cuales sufren un entrecruzamiento ultrarrápido de extensina y PRP, son más resistentes a la digestión por hidrolasas productoras de protoplastos. Las extensinas también podrían aglutinar patógenos, ya que al ser moléculas cargadas positivamente, pudieran interactuar iónicamente con las superficies cargadas negativamente de ciertos patógenos. Por último, como se verá más adelante en este capítulo, existe evidencia de que las extensinas interactúan con proteínas transmembranales y de este modo estabilizan los microtúbulos corticales (Akashi y Shibaoka, 1991).

Proteínas ricas en prolina

Las proteínas ricas en prolina (PRP) representan otra clase relativamente nueva de proteínas de pared en las que algunas y tal vez todas contengan Hyp. Existen dos subclases de PRP: unas que son componentes normales de las paredes celulares (Chen y Varner, 1985; Hong y cols., 1990; Averyhart-Fullard y cols., 1988; Tierney y cols., 1988; Datta y Marcus, 1990; Kleis-San Francisco y Tierney, 1990; Lindstrom y Vodkin, 1991; Sheng y cols., 1991), y otras que son nodulinas (proteínas producidas en respuesta a la infección por bacterias fijadoras de nitrógeno) y que constituyen parte de las paredes celulares de nódulos (Franssen y cols., 1987; Scheres y cols., 1990; Van de Wiel y cols., 1990; Govers y cols., 1991). La distinción entre estas dos clases tal vez no sea muy clara, ya que dos PRP-nodulinas de chícharo, ENOD12A y ENOD12B, también se expresan en tallos y flores (Scheres y cols., 1990; Govers y cols., 1991).

Todas las PRP están caracterizadas por la presencia de secuencias repetidas de Pro-Pro contenidas dentro de una variedad de otras unidades repetidas más grandes. Por ejemplo, varias de las PRP y algunas nodulinas como la ENOD2 de alfalfa, soya y chícharo se caracterizan por la presencia del pentapéptido Pro-Pro-X-Y-Lys, donde la X y la Y pueden ser Val, Tyr, His o Glu. En algunos casos, el pentapéptido contiene tres residuos de Pro conti-

guos. Las PRP que han sido aisladas y caracterizadas no están glicosiladas, o lo están ligeramente y contienen aproximadamente cantidades equimolares de Pro e Hyp (Averyhart-Fullard y cols., 1988; Kleis-San Francisco y Tierney, 1990). La obtención de la secuencia de aminoácidos de una PRP de testa de soya ha mostrado que la Hyp ocupa, exclusivamente, la segunda posición del pentapéptido (Pro-Hyp-X-Y-Lys) (Lindstrom y Vodkin, 1991), en tanto que una PRP de gimnospermas muestra dos hexapéptidos, en los cuales la Hyp se encuentra en la segunda y tercera posición de uno de ellos, y en la tercera posición del otro (por ejemplo, Pro-Hyp-Hyp-Val-Tyr-Lys y Pro-Pro-Hyp-Val-Val-Lys, respectivamente) (Kieliszewski y cols., 1992).

Los genes correspondientes a las PRP también han sido caracterizados en plantas monocotiledóneas (José-Estanyol y cols., 1992). La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para una de las PRP de maíz indica que ésta consiste de un dominio aminoterminal con numerosas repeticiones de Pro-Pro-Tyr-Val y Pro-Pro-Thr-Pro-Arg-Pro-Ser, y de un dominio pobre en Pro, hidrofóbico y con varios residuos de Cys, localizado en el extremo carboxilo.

Regulación de la expresión

Los estudios de regulación indican que las PRP están implicadas en varios aspectos del desarrollo de una planta, que van desde la germinación hasta los estadios tempranos de nodulación (José-Estanyol y cols., 1992; Scheres y cols., 1990). Además, tanto heridas, elicitores endógenos y de hongos, etileno y luz pueden afectar la expresión génica de las PRP (Tierney y cols., 1988; Sheng y cols., 1991).

Miembros de la familia multigénica de las PRP exhiben patrones de expresión específicos de células y tejidos. En plantas dicotiledóneas, las PRP comúnmente muestran un patrón de localización similar al de las proteínas ricas en glicina (GRP); sin embargo, se ha notificado que algunas PRP se expresan en los mismos tipos celulares donde se localizan las extensinas (Showalter, 1993).

Interacciones intermoleculares y funciones

Es problable que las PRP, al igual que las extensinas y las GRP, se insolubilicen en la pared. De hecho, hay datos que apoyan esta hipótesis (Kleis-San Francisco y Tierney, 1990). Dicho proceso de insolubilización puede ocurrir rápidamente en respuesta a estrés y está mediado por la liberación de peróxido de hidrógeno y catalizado por una peroxidasa de pared (Bradley y cols., 1992). Las interacciones moleculares que causan esta insolubilización se desconocen. Sin embargo, el contenido relativamente alto de Tyr en las PRP permitiría la formación de enlaces de isoditirosinas entre moléculas de PRP y/o entre PRP y GRP o extensinas, dada la localización conjunta de éstas. La asociación de las PRP y las GRP en tejidos que sufren lignificación como el xilema y las fibras hace suponer que estas proteínas están implicadas en

el proceso de lignificación (Ye y cols., 1991). Además, ya que las PRP son proteínas básicas, por su alto contenido en Lys, y la extracción con sal puede, parcialmente, solubilizarlas de la pared, se podría proponer que las PRP interactúan iónicamente con otros componentes de la pared como las pectinas ácidas, como sucede en el caso de las extensinas.

Las PRP parecen tener papeles importantes en la formación y en el desarrollo normal de nódulos de raíz. Con base en los patrones de expresión de la ENOD2, una clase de PRP, en soya, alfalfa y chícharo, se propone que esta nodulina está involucrada en la morfogénesis del nódulo. En particular, se propone que esta ENOD2 produce en la pared celular del parénquima del nódulo una barrera contra el oxígeno con el fin de proteger a la nitrogenasa, una enzima altamente sensible al oxígeno (Van de Wiel y cols., 1990). Por el contrario, otra clase de PRP, la nodulina ENOD12, que también participa en el proceso de infección bacteriana, se piensa que está involucrada en otros procesos de desarrollo presentes en otros tejidos de la planta (Scheres y cols., 1990). Recientemente, la nodulina ENOD2 de frijol de soya fue purificada y caracterizada (Cassab y cols., en Carpita y cols., 1996). ENOD2 presenta cantidades equimolares de Hyp y Pro, al igual que otras PRP, pero los niveles de Val y Tyr son mucho más bajos que los observados en otras PRP. En cambio, los niveles de Glu e His son muy altos en ENOD2 y muy bajos en otras PRP. Aparentemente, la ENOD2 también se insolubiliza en la pared, pero por falta de residuos de Tyr quizás no lo haga mediante isoditirosinas sino por otro tipo de enlaces o interacciones iónicas. Si plantas de frijol son cultivadas en ausencia del micronutriente B, los nódulos de raíz tienen un peso menor y fijan hasta 50% menos nitrógeno que nódulos de plantas control (Cassab y cols., en Carpita y cols., 1996). Estos nódulos, además, presentan una corteza irregular, el parénquima del nódulo está ausente y hay muy pocas células infectadas. Curiosamente, no se puede detectar ENOD2 en las paredes celulares de nódulos deficientes en B mediante técnicas de inmunolocalización, pero sí en nódulos control. Por otro lado, los niveles de Hyp en paredes celulares de nódulos deficientes en B también son muy bajos, lo cual indica que la ENOD2 no se está insolubilizando cuando el B no está presente. Como ya se había mencionado anteriormente, el B es un componente importante de las paredes celulares y además está asociado covalentemente a la fracción RG-II de pectinas (Kobayashi y cols., 1996). Se propone que, al no estar presente la fracción de B + RG-II en las paredes del parénquima del nódulo, ENOD2 no puede ensamblarse en la pared. Esto trae por consecuencia que el parénquima del nódulo no se desarrolle normalmente y no forme la barrera contra oxígeno necesaria para la fijación de nitrógeno.

Existe una identidad a nivel de secuencia entre las PRP y las extensinas (tabla 18-2). Ésta se observa mejor al comparar la secuencia Pro-Pro-Val-Tyr-Lys presente en varias PRP con la secuencia Ser-Hyp_4-Val-Tyr-Lys presente en las extensinas de zanahoria, tabaco, soya y petunia. De la misma manera, se puede observar similitud entre la secuencia de ENOD2 Pro-Pro-His-Glu-Lys-Pro-Pro y la secuencia de la extensina de betabel Hyp-Hyp-Val-His-Glu-Tyr-Pro-Hyp-Hyp. Interesantemente, anticuerpos policlonales contra extensina de la testa de soya reconoce a ENOD2 de frijol y soya, lo

cual podría ser debido a que existen secuencias similares entre las dos proteínas.

Finalmente, existe similitud entre secuencias de las PRP y extensinas con secuencias de la proteína adhesiva de mejillones (MAP). Esto es, la secuencia de MAP Hyp-Hyp-Thr-Tyr-Lys (Waite, 1992) se asemeja bastante a la secuencia Pro-Hyp-Val-Tyr-Lys de PRP y a Thr-Hyp-Val-Tyr-Lys de la extensina P1 de tomate. La importancia de estas similitudes podría estar relacionada con dos propiedades fisicoquímicas de MAP: 1) la adhesión, ya que actúa como una goma adhesiva bajo el agua desplazando agua y uniéndose de manera no covalente con el sustrato, y 2) la cohesión, ya que el enlace covalente entre la Tyr-9 y Lys forma un entrecruzamiento intermolecular que podría contribuir a la fuerza cohesiva de las hebras de MAP (Nagafuchi, 1992).

Proteínas ricas en glicina

Las GRP representan una clase relativamente nueva de proteínas de la pared.

Las GRP representan una clase relativamente nueva de proteínas de la pared que contienen hasta 70% de Gly arreglada en secuencias repetidas cortas. El primer gen de GRP fue aislado por Condit y Meagher (1986). El gen purificado contenía 67% de Gly arreglada en unidades repetidas de Gly-X, donde X frecuentemente es Gly, pero también puede ser Ala o Ser. El hecho de que este gen contiene una secuencia de péptido-señal, junto con los datos que muestran que una fracción de pared de testa de calabaza contiene 47% de Gly (Varner y Cassab, 1986) sugirió que esta GRP era una proteína de pared celular. Posteriormente, Keller y cols. (1988) aislaron una clona genómica de frijol que contenía dos genes de GRP ligados que codificaban proteínas con un contenido de 63 y 58% de Gly y que contenían la secuencia repetida de Gly-X, similares a las encontradas en el gen de petunia. Varios grupos han aislado y caracterizado cDNA o genes de GRP de tomate (Godoy y cols., 1990; Showalter y cols., 1991), *Arabidopsis* (De Oliveira y cols., 1990), tabaco (Van Kan y cols., 1988) y *Chenopodium rubrum* (Kaldenhoff y Richter, 1989). La mayoría de estas clonas predicen la presencia del péptido-señal en el extremo amino. La idea de que estas GRP se localizan en la pared ha sido verificada por estudios de inmunolocalización con anticuerpos contra GRP de petunia y frijol (Keller y cols., 1988 y 1989; Condit y cols., 1990).

Las GRP no están limitadas a plantas dicotiledóneas o a la pared celular. Se han aislado genes que codifican GRP en maíz (Gómez y cols., 1988) y arroz (Mundy y Chua, 1988) y cDNA para GRP en maíz (Didierjean y cols., 1992), sorgo (Crétin y Puigdomènech, 1990) y cebada (Rohde y cols., 1990). El gen de GRP de maíz codifica para una proteína con 37% de Gly y consiste sólo en repeticiones de Gly-Gly-Tyr-Gly-Gly y Arg-Glu. Un gen de GRP de arroz codifica para una proteína que contiene sólo 25% de Gly sin unidades repetidas reconocibles (Mundy y Chua, 1988). Interesantemente, ni la GRP de maíz ni la de arroz contienen la secuencia de péptido-señal, por lo que su localización en la pared celular es incierta. De hecho, anticuerpos contra la GRP de arroz muestran una localización citosólica de esta proteína.

Algunas de las GRP que no presentan péptido-señal contienen secuencias de unión a RNA (Sturm, 1992). Por el contrario, otra GRP de arroz presenta péptido-señal y la proteína contiene 67% de Gly (Lei y Wu, 1991). Esta GRP de arroz es claramente homóloga a la de petunia y a una de las de frijol, e inclusive el anticuerpo contra la GRP de frijol reconoce a una proteína de paredes celulares de arroz. El cDNA que codifica para una GRP de cebada indica que ésta, además de presentar un péptido-señal, posee una cierta homología con las citoqueratinas de vertebrados.

Regulación de la expresión

Como se muestra en la tabla 18-2, las GRP tanto de plantas dicotiledóneas como de monocotiledóneas se expresan en respuesta a una gran variedad de condiciones de estrés y desarrollo (Condit y Meagher, 1986; Keller y cols., 1988; Condit y cols., 1990; De Oliveira y cols., 1990; Showalter y cols., 1991; Mundy y Chua, 1988; Gómez y cols., 1988; Lei y Wu, 1991; Didierjean y cols., 1992).

Las GRP de plantas dicotiledóneas se localizan, por lo general, en haces vasculares particularmente en elementos del xilema y están claramente asociadas con células que van a lignificarse. Además, estas GRP comúnmente se colocalizan con las PRP. Por el contrario, Gómez y cols. (1988) localizaron al mRNA de la GRP de maíz en la epidermis escutiforme que rodea al embrión y en la epidermis de las hojas embrionarias.

Interacciones intermoleculares y funciones

Hasta la fecha se propone que hay dos clases de GRP. Una que se localiza en la pared celular y está regulada durante el desarrollo, y otra que se localiza en el citoplasma y está regulada por una gran variedad de condiciones de estrés, incluidos el ácido abscísico y la sequía. Ambas clases de GRP están representadas en di- y monocotiledóneas. Las GRP de pared celular posiblemente sean proteínas estructurales con funciones importantes en el sistema vascular y la cicatrización de heridas. Predicciones sobre la estructura secundaria de las GRP de pared indican que podrían existir como laminillas plegadas tipo-β. Dicha estructura podría proveer elasticidad así como fuerza tensil durante el desarrollo y la función del tejido vascular. Se ha sugerido que las GRP de pared podrían funcionar como sitios de iniciación para el depósito correcto de lignina en las paredes del xilema (Keller y cols., 1989). Las GRP que no están en la pared celular podrían tener un papel en la tolerancia a sequía y en la cicatrización de heridas. Además, la presencia de un sitio de unión a RNA en algunas de estas GRP podría indicar otra función.

Una de las GRP de frijol aparentemente se insolubiliza en la pared celular (Keller y cols., 1989); sin embargo, a la fecha se desconoce si esta característica es aplicable a las demás GRP. También se desconoce el mecanismo de insolubilización. Una posibilidad es que se formen uniones intermolecu-

lares de isoditirosinas con otras moléculas de GRP u otras proteínas de pared celular. Posiblemente, las GRP interactúen con las PRP dada su colocalización, o con lignina puesto que se depositan en tejidos destinados a lignificarse (Ye y cols., 1991).

Proteínas de Arabinogalactanos

Estructura

Las proteínas de arabinogalactanos (AGP) son HRGP muy solubles y altamente glicosiladas, como su nombre lo indica, con L-Ara y D-Gal. El peso representado por la parte proteica de las AGP es bajo y va de 2 a 10% del peso de la glicoproteína total (Fincher y cols., 1983; Showalter, 1993). Las AGP están presentes en todas las plantas, desde briofitas hasta plantas superiores, y son componentes de la pared celular y membrana plasmática. Los pesos moleculares de las AGP son extremadamente heterogéneos, debido a los diferentes grados de glicosilación. Las AGP se extraen fácilmente con *buffers* de baja fuerza iónica y también son solubles en sulfato de amonio saturado. Dichas propiedades de solubilización han facilitado en gran parte su aislamiento y caracterización. La parte proteica de las AGP es típicamente rica en Hyp, Ser, Ala, Thr y Gly y es resistente a proteólisis en su estado nativo debido a su alta glicosilación. Las AGP tienen puntos isoeléctricos en el rango de 2 a 5. La secuencia amino-terminal de cuatro AGP, tres de zanahoria y una de centeno, han sido determinadas; las cuatro contienen repeticiones de Ala-Hyp. Asimismo, han sido determinadas las secuencias de cinco péptidos trípticos de una AGP desglicosilada de centeno; y algunas de éstas también contienen repeticiones de Ala-Hyp (Gleeson y cols., 1989). El primer gen para una AGP de tomate fue aislado utilizando un oligonucleótido sintético de DNA, diseñado en base a una secuencia de aminoácidos común en AGP de *Lolium*, rosa y zanahoria (Hyp-Ala-Hyp-Ala-Hyp) (Showalter y Li, 1996, en Carpita y cols., 1996). La composición de aminoácidos deducida de la secuencia de este gen indica que esta AGP contiene 20% Ala, 22% Pro, 10% Gly y 11% Ser y presenta dos pentapéptidos de Pro-Ala-Pro-Ala-Pro y 16 repeticiones del dipéptido Ala-Pro, lo cual está de acuerdo con las composiciones de aminoácidos y secuencias de otras AGP conocidas. Recientemente, dos nuevas glicoproteínas de las paredes y líquidos extracelulares de pistilos de *Nicotiana alata* (Schultz y cols., en Carpita y cols., 1996) que, a pesar de contener más de 20% de Hyp/Pro y carbohidratos enriquecidos en Gal y Ara, no son catalogadas como AGP. Una de estas glicoproteínas presenta dominios de Ser-Pro_{2-7} y motivos Pro_4-Ala + Pro_{2-3}. Dos de estos dominios tienen uniones tipo-*O* como los presentes en extensinas (cadenas cortas de Ara), mientras que el tercer dominio contiene uniones tipo-*O* como los presentes en AGP (cadenas de galactanos). Una glicoproteína de estigmas, rica en galactosa (GaRSGP), contiene un dominio rico en Pro-X-Lys-Pro-Pro característico de PRP, y está cubierto por cadenas cortas de galactanos, teniendo como aminoácidos más abundantes Hyp, Pro y Lys. Otro tipo de AGP de células en suspensión de zanahoria también

ha sido comunicado recientemente por el grupo de Keith Roberts (John Innes Centre, en Carpita y cols., 1996). En contraste con las AGP clásicas, esta AGP no contiene Hyp, es un mosaico de péptidos ricos en Pro, Cys e His y es homóloga a una PRP, aunque sí se une al antígeno de Yariv como todas las AGP (ver más adelante). Aunque la función de esta AGP aún se desconoce, se sabe que se une a algunas pectinas (pero no a homogalacturonato) y que los dominios ricos en His parecen estar involucrados en esta unión.

Como ya se mencionó anteriormente, los carbohidratos representan la mayor parte del peso de las AGP. Análisis estructurales han mostrado que éstos consisten en cadenas de polisacáridos con uniones 1 a 3 de residuos β-D-galactopiranosa ramificadas con cadenas laterales con uniones 1 a 6 de β-D-galactopiranosa que además están ramificadas con arabinofuranosa y otros monosacáridos menos abundantes (Fincher y cols., 1983). Además, dichas cadenas están unidas regularmente a la parte proteica vía uniones de β-D-galactopiranosa-Hyp (Bacic y cols., 1987). Por otro lado, cabe mencionar que polisacáridos similares a los presentes en AGP también existen en la pared celular sin estar asociados a proteína; siendo éstos los arabinogalactanos.

La localización celular de varias AGP no se ha logrado definir debido a su solubilidad extrema. Es claro, sin embargo, que las AGP forman parte del medio extracelular. Células en cultivo en suspensión de varios tejidos y plantas secretan AGP al medio de cultivo; también, ciertas células especializadas, como las células de los canales de los estilos y otras células secretoras, producen exudados gomosos ricos en AGP. Además, algunas AGP están asociadas con la membrana plasmática (Pennel y cols., 1989; Norman y cols., 1990). El antígeno de Yariv, un antígeno artificial contra residuos β-D-glucosil, precipita específicamente a la mayoría de las AGP como un complejo rojo-naranja y ha sido de enorme uso en estudios de localización de AGP en diversos tejidos, aun cuando no se conoce el mecanismo de interacción entre ellos (Fincher y cols., 1983). Esta interacción también indica que las AGP son lectinas tipo β, con amplia especificidad dirigida a uniones tipo β-D-glicopiranosil.

La separación electroforética de AGP en presencia del antígeno de Yariv muestra que las AGP se expresan de manera tejido-específica y que un tejido dado puede contener más de una clase de AGP (Van Holst y Clarke, 1986). Sin embargo, no se sabe con claridad si las diferencias observadas en AGP mediante esta técnica indican distintas partes proteicas, carbohidratos, o ambas. De este modo, se ha mostrado que un grupo de AGP de la membrana plasmática de tabaco presenta glicosilación diferencial de una proteína de 50 kD (Norman y cols., 1990).

Dicroísmo circular ha mostrado que 30% de la parte proteica de una AGP se encuentra en forma de hélice de poliprolina II, al igual que las extensinas. Muy poco se sabe sobre la conformación del resto de la proteína y de las cadenas de polisacáridos. Un modelo basado tanto en los datos anteriores como en la baja viscosidad de las AGP predice que los carbohidratos tendrían formas ovoides o esféricas unidas en varias posiciones de la proteína (Fincher y cols., 1983).

Expresión regulada y funciones

Hasta la fecha no se ha establecido una función clara para las AGP. Con fundamento en su localización predominantemente extracelular, y en sus varias propiedades fisicoquímicas, se ha propuesto que las AGP actúan como gomas, lubricantes y humectantes (Fincher y cols., 1983). Su gran abundancia en la lamela media de la pared, en los estilos de las angiospermas y en la parte central de nódulos de raíz las hace fuertes candidatas para funcionar en el reconocimiento célula-célula (Cassab, 1986). Recientemente, también se ha comunicado que las AGP se acumulan en respuesta a heridas (Kjellbom y cols., en Carpita y cols., 1996).

El hecho de que la expresión de las AGP de la membrana plasmática se regule durante el desarrollo de flores, embriones y raíces (Knox y cols., 1991; Pennel y cols., 1989) ha sugerido que estas AGP tienen un papel en la diferenciación e histogénesis de estos tejidos. Dicho papel podría implicar interacciones célula-célula en las cuales las AGP actuarían como moléculas adhesivas análogas a las moléculas de adhesión en mamíferos, capaces de unirse a ligandos no identificados de la pared celular (Pennel y cols., 1989).

Finalmente, la embriogénesis somática es altamente dependiente de proteínas que la promueven (Kreuger y Van Holst, 1993) o la inhiben. Estas proteínas son de pared celular y varias son AGP. Una mutante embrionaria somática de zanahoria es rescatada por una endoquitinasa de la MEC de embriones silvestres así como por lipooligosacáridos de *Rhizobium*. Se ha propuesto la hipótesis de que el papel de la endoquitinasa sería el liberar enzimáticamente una molécula señal análoga a los factores Nod de *Rhizobium* a partir de un precursor con *N*-acetilglucosamina, aún no identificado, presente en bajas cantidades en la pared celular de células vegetales. Recientemente, se identificaron residuos de *N*-acetilglucosamina en dos AGP de betabel (Kjellbom y cols., en Carpita y cols., 1996) que pudieran ser el precursor de la molécula señal necesaria para la inducción de embriogénesis somática.



Enzimas de la matriz extracelular

Varias enzimas han sido detectadas en la pared celular de plantas superiores y posiblemente tengan un papel importante en su metabolismo. Estas enzimas son generalmente glicoproteínas y pueden aislarse en forma relativamente fácil de la pared celular. De todas las glicoenzimas, las peroxidasas son las mejor estudiadas. Las peroxidasas pueden catalizar entrecruzamientos fenólicos entre macromoléculas como lignina, proteína, hemicelulosa y ácido ferúlico (Cassab y Varner, 1988). También, las peroxidasas parecen estar involucradas en diversos procesos de desarrollo como en la formación de traqueidas en células de *Zinnia* y en las reacciones de incompatibilidad durante la fertilización de plantas (Carraro y cols., 1986). Además, las peroxidasas participan en la biosíntesis de pared nueva, la cual podría ser de vital importancia en la respuesta defensiva contra el ataque de patógenos. Las

> Varias enzimas que han sido detectadas en la pared celular de plantas superiores son generalmente glicoproteínas.

peroxidasas se inducen por heridas y pudieran reparar paredes dañadas al producir una barrera impermeable sobre la herida, ya que depositan compuestos poliméricos alifáticos y aromáticos.

Las hidrolasas son otra clase de enzimas que desempeñan un papel en la defensa contra patógenos. Por lo general, están localizadas en el compartimento lítico de las células, que incluye a las vacuolas y MEC. Algunas hidrolasas se secretan al espacio apoplástico y se extraen fácilmente con sal de la pared (β-glucosidasa), aunque en otros casos su actividad (α-manosidasa) no puede removerse ni con tratamiento secuencial de sal. Las hidrolasas que se han localizado en el compartimento de la MEC son β-1,3-glucanasa, celulasa, arabinosidasa, β-fructofuranosidasa, α-galactosidasa, β-galactosidasa, α-manosidasa, β-manosidasa, trehalasa, β-glucosidasa, β-glucuronidasa, β-xilosidasa y fosfatasa ácida. Sin embargo, varias hidrolasas se encuentran exclusivamente en la vacuola: quitinasa-*N*-acetilglucosaminidasa e inhibidores de proteínas (Cassab y Varner, 1988).

La β-1,3-glucanasa es una enzima muy abundante en plantas superiores. La calosa (β-1,3-glucano) es el sustrato de esta enzima presente en células y tubos cribosos, en aposiciones celulares formados en respuesta a heridas y en paredes primarias. La celulasa desempeña un papel importante en la degradación de paredes celulares en plantas y ha sido muy estudiada con respecto a la abscisión de hojas. Se han aislado dos clases de celulasas, una que es específica de abscisión y la otra que se presenta constitutivamente en todos los tejidos vegetales cuya función se desconoce. También, las celulasas están implicadas en la maduración de frutos carnosos, en especial del aguacate. El tratamiento con etileno incrementa los niveles de celulasas en ambos procesos.

Existen numerosas α-manosidasas y β-glucosidasas en plantas; sin embargo, no se ha explorado su función precisa. Se presume que las α-manosidasas funcionan en el recambio de glicoproteínas y en el procesamiento de oligosacáridos implicados en la síntesis de diversas glicoproteínas. Las β-glucosidasas podrían estar involucradas en la biosíntesis de lignina (Cassab y Varner, 1988).

Las β-fructofuranosidasas (invertasas) son unas de las enzimas que se conocen con mayor antigüedad, aislada por primera vez de levadura por Berthelot en 1860. La invertasa tiene una función importante en órganos de almacenamiento, donde rompe la sacarosa. La sacarosa es el carbohidrato libre más abundante y con mayor transporte en plantas, de ahí que las invertasas desempeñen un papel muy importante en su metabolismo y regulación. Se han comunicado formas de invertasa solubles y unidas a la pared celular.

Las α-galactosidasas están ampliamente distribuidas en plantas y su presencia está relacionada con tejidos que contengan oligo- o polisacáridos con residuos α-D-galactosil, especialmente en órganos de almacenamiento. Otra posible función podría ser el proteger a las plantas de sustancias fitotóxicas α-galactosídicas. El papel fisiológico de las β-galactosidasas no es muy claro. Parecen estar involucradas en la degradación de galactolípidos y, por lo tanto, cambiar características de membranas. Sin embargo, el hecho de que se localicen en la pared y estén presentes en

puntas de raíces de varias plantas implica que tienen significancia fisiológica .

La trehalasa se ha encontrado en varias especies de plantas y en varios tejidos, especialmente en polen y nódulos de raíz. Sin embargo, su sustrato, la trehalosa (1-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranósido), se ha encontrado recientemente en plantas superiores tolerantes a la desecación, aunque es común en bacterias y hongos (Müller y cols., 1995). La trehalosa puede ser tóxica para plantas con baja actividad de trehalasa. Se ha sugerido que la actividad de trehalasa podría proteger a las plantas de los efectos dañinos de la trehalosa microbiana. El polen de varias plantas contiene trehalasa e inclusive puede germinar en medio con trehalosa como única fuente de carbono. Sin embargo, la función de la trehalasa en polen se desconoce. Por otro lado, la trehalasa podría considerarse como nodulina en el caso de nódulos de frijol de soya, donde se localiza extracelularmente, y pudiera hidrolizar trehalosa originada en los bacteroides, además de tener un papel esencial en el desarrollo de nódulos (Müller y cols., 1995).

Las β-glucoronidasas no han sido muy estudiadas, pero se han encontrado en las paredes de polen de *Portulaca grandiflora*, donde sus niveles se incrementan durante la germinación del polen. El papel de esta enzima, como en el caso de otras glicosidasas, se desconoce (Dey y Campillo, 1984). Las β-xilosidasas, también conocidas como hemicelulasas, podrían tener un papel en la degradación de xiloglucanos que como ya se mencionó son componentes importantes de la pared celular. Las β-xilosidasas parecen participar en la movilización de componentes de la pared celular en flores marchitas de *Ipomea tricolor*, en la maduración de frutos como aguacate, y también en las interacciones huésped-patógeno.

Finalmente, la fosfatasa ácida es la hidrolasa más abundante de la pared celular en algunos tejidos. El significado de la presencia de esta enzima en la MEC se desconoce, ya que los ésteres de fosfato nunca salen de la célula. Su posible papel podría estar en las interacciones planta-patógeno.

Casi todas las hidrolasas mencionadas anteriormente tienen sustratos endógenos así como sustratos exógenos potenciales presentes en paredes celulares o productos de patógenos. La mayoría de las hidrolasas están presentes en formas múltiples. Un grupo de isozimas podría estar involucrado en metabolismo primario, mientras que otras pudieran haber evolucionado propiedades útiles en la defensa contra patógenos. Sin embargo, algunas hidrolasas (por ejemplo, trehalasa), aun cuando están presentes en varias plantas, no cuentan con su sustrato ortodoxo, excepto en nódulos de raíz y en algunas plantas tolerantes a la desecación. La posibilidad de que esta enzima contribuya a la defensa contra patógenos no puede excluirse.

Las metilesterasas de pectina se han encontrado en todas las especies de plantas superiores estudiadas y también son producidas por un gran número de hongos y bacterias fitopatógenas. Las metilesterasas de pectina vegetales participan en la conversión de propectina a pectina soluble y pectato y están involucradas en la maduración de tejidos y en mecanismos de protección contra infecciones. Esta enzima cataliza la desesterificación de pectina y es altamente específica para D-galacturonanos. Se ha sugerido que la gradual desesterificación de pectinas ocasionada por metilesterasas

de pectina produce cambios en las propiedades gelificantes de la pared que afectan las interacciones entre diversos polímeros asociados con crecimiento y desarrollo (Yamaoka y Chiba, 1983). Gran atención se le ha dado a la metilesterasa de pectina de tomate, pues es muy abundante en frutos en desarrollo, inclusive se han aislado clonas de cDNA y se han realizado experimentos en plantas transgénicas que expresan el gen para esta enzima en antisentido (Tieman y cols., 1992). Dichos experimentos han mostrado que la falta de metilesterasas de pectina altera la química de pectinas y los sólidos solubles en el fruto del tomate.

Las endopoligalacturonasas también están ampliamente distribuidas en plantas. La fuente más rica de esta enzima, al igual que de la pectín-metilesterasa es el fruto del tomate en desarrollo. Ambas enzimas están ampliamente distribuidas, ya que las pectinas están presentes en la mayoría de las paredes celulares, pero son particularmente abundantes en tejidos jóvenes y en frutos. El papel de esta enzima en la degradación de paredes celulares ha sido establecido firmemente. Los niveles de endopoligalacturonasa se regulan durante el desarrollo de la maduración de frutos de tomate. Tanto la actividad de endopoligalacturosas como la presencia de la enzima están completamente ausentes de frutos maduros verdes e incrementan dramáticamente al avanzar el proceso de maduración. Clonas de cDNA de endopoligalacturonasa se han aislado a partir de bibliotecas de cDNA construidas con mRNA obtenidos de tomates maduros-rojos en donde el gen se expresa hasta 2,000 veces más que en frutos inmaduros-verdes (Della Penna y cols., 1986).

La mayoría de las enzimas de la MEC parecen estar involucradas en la protección de plantas a heridas y al ataque por patógenos. Sin embargo, es difícil evaluar el grado en el cual estas enzimas contribuyen a dar resistencia a las plantas. Por otro lado, dichas enzimas también podrían ser componentes importantes de la pared, ya que participarían en la determinación de la estructura de la pared durante el desarrollo de las plantas (Cassab y Varner, 1988). De ahí que quede mucho trabajo por hacer para entender cómo se lleva a cabo la regulación de la síntesis y degradación de polisacáridos de la pared celular.



Ensamblaje de la pared celular

La pared celular desde el punto de vista del autoensamblaje no ha sido estudiada, a pesar de ser una maravilla “nanotecnológica” (Kieliszewski y Lamport, 1994). De ahí que sería muy interesante entender los principios biológicos de su autoorganización y autoensamblaje: ¿cómo es que moléculas complejas se ensamblan espontáneamente en estructuras tridimensionales “vivientes”?

El plan general arquitectónico de la pared que involucra a un material fibroso embebido en una matriz amorfa, no es exclusivo de plantas superiores (Varner y Lin, 1989). Animales superiores utilizan colágena como material fibroso; hongos y artrópodos, quitina y plantas superiores, celulosa. Los materiales de la matriz que han evolucionado son complejos: en anima-

les son principalmente mucopolisacáridos; en artrópodos son proteínas; y en plantas son hemicelulosas y pectinas. En plantas superiores, el papel de las microfibrillas de celulosa es relativamente constante. Aun cambios en ángulos de depósito pueden verse como ajustes menores. Con la inclusión de una capa de xiloglucanos (o xilanos) unidos fuertemente por puentes hidrógeno a las microfibrillas, surgen oportunidades para ajustes finos en las interacciones entre el complejo microfibrilar-xiloglucanos y la matriz. Como ya se mencionó anteriormente, la matriz contiene varios carbohidratos complejos. Dentro de cualquier pared celular, las posibilidades de modular las propiedades de la matriz al hidrolizar selectivamente unos cuantos enlaces éster y/o glicosídicos son enormes. Asimismo, modulando las proporciones de los diferentes materiales de la matriz secretados por los diferentes tipos celulares, se incrementaría el rango de las propiedades de la matriz. Parece incuestionable que los requerimientos del desarrollo y de los mecanismos de respuesta a las diferentes condiciones de estrés ambiental impuestas en la pared han resultado en la evolución de grupos de genes y controles genéticos sofisticados que modulan su estructura de acuerdo a la demanda.

¿Qué podríamos decir sobre la colocación de los diferentes componentes de la matriz en la pared? Como ya se mencionó anteriormente, el depósito de varios componentes de la matriz ni es al azar, ni es el mismo en las diferentes paredes de la misma célula (Freshour y cols., 1996). Las reglas que se siguen para determinar cuáles componentes de la matriz y dónde se depositan en la pared faltan por descubrirse.

¿Cómo se ensamblan en la MEC las proteínas de la pared? Como ya se enfatizó, hay oportunidades múltiples entre las moléculas de extensinas, PRP, GRP para establecer enlaces electrovalentes y/o covalentes reversibles y/o irreversibles. El nivel de las extensinas en los diferentes tejidos de la misma planta varía hasta por un factor de 20 (Cassab y Varner, 1988), y los niveles de pectinas también varían considerablemente. En las paredes donde tanto las pectinas como las extensinas son abundantes, las interacciones electrovalentes entre los dos polímeros con cargas opuestas parece inevitable. Estas interacciones pudieran estar moduladas por pH (los pK de los ácidos urónicos andan en el rango de 3 a 5, y las extensinas entre 6 y 7), el grado de esterificación de pectinas, la concentración de Ca^{2+} y la movilidad y coeficientes de difusión de estas macromoléculas. En soluciones diluidas las pectinas metilesterificadas forman geles débiles a pH ácidos y bajo potencial de agua. Las pectinas desesterificadas forman geles fuertes en presencia de Ca^{2+} (o Ba^{2+}, Sr^{2+}, Cu^{2+} y Co^{2+}, pero no Mg^{2+}) (Thibault y Rinaudo, 1986). Las pectinas que están parcialmente desesterificadas forman también geles fuertes al añadirles Ca^{2+}, siempre y cuando presenten ácidos urónicos libres en bloques. De ahí que, si se agrega Ca^{2+} a segmentos de tallo, éstos se endurecen y ya no pueden elongarse. Por el contrario, al añadir compuestos quelantes de Ca^{2+} los tejidos se ablandan. Se propone, por lo tanto, que estos factores —concentración de pectina, actividad de metilesterasa, pH y concentración de Ca^{2+}— controlan varias características arquitectónicas importantes de la pared, aunque el mecanismo preciso se desconozca.

El que las extensinas se entrecrucen entre sí para formar una malla cuando la célula ha dejado de alargarse es de entenderse, por ejemplo, en la testa en desarrollo de frijol de soya; la extensina presente sólo es soluble hasta los últimos estadios de maduración de la semilla, después resulta imposible extraerla (Cassab y Varner, 1987). La idea de una malla de extensina insoluble entrecruzada resulta atractiva al analizar la función de las células ricas en extensina, como las esclereidas de la testa de las leguminosas que son elementos esqueléticos de la planta; o las células asociadas con los haces vasculares que también dan soporte; o las células de la epidermis que dan protección; y tejidos heridos o infectados con patógenos que necesitan producir una barrera para defenderse (Cassab y Varner, 1988).

En tejidos en crecimiento, las paredes tienen que ser estructuras dinámicas.

En tejidos en crecimiento, las paredes tienen que ser estructuras dinámicas, y la pared de cada célula tiene que acoplarse al plan que produce un órgano o tejido característico. Las paredes de los diferentes tejidos de la planta sirven para funciones diferentes y, por lo tanto, tienen estructuras diferentes. En tallos en crecimiento, por ejemplo, la epidermis está con tensión física, mientras que los tejidos internos están con compresión. Las diferencias químicas y arquitectónicas entre las paredes de las células epidermales y los tejidos internos se desconocen, aunque las paredes de las células epidermales son mucho más gruesas.

¿Dónde se localizan las enzimas dentro de la pared? Asumiendo que existe un orden así como inmovilidad de los componentes estructurales de la pared, las enzimas implicadas en los rearreglos deben ser móviles; esto es, tener la capacidad de encontrar el sitio que necesita atención. ¿Qué mantiene a las enzimas en guardia? Quizás algunas de ellas son agentes libres, pero, sin embargo, están limitadas en su acción por un número de configuraciones estructurales de la pared. Otras podrían estar controladas por pH, concentración de Ca^{2+}, sustrato (por ejemplo, el malato, en el caso de la malato-deshidrogenasa de pared, está implicado en la producción de peróxido de hidrógeno utilizado en la biosíntesis de lignina), o tal vez cambios en la conformación del gel en el que están embebidas.

Las oligosacarinas son fragmentos de paredes celulares de hongos y plantas que producen una gran variedad de respuestas en las plantas (McNeil y cols., 1984). Estas respuestas incluyen la síntesis de fitoalexinas (antibióticos), la síntesis de inhibidores de proteasas (proteínas que inhiben proteasas microbianas y de insectos), la inhibición del crecimiento inducido por auxinas, la inhibición de la floración, muerte celular, la síntesis de etileno y de extensinas. El hecho de que la célula pueda desprender diferentes señales a partir de fragmentos de su pared y que éstas provocan respuestas en el resto de la planta parece constituir una manera eficiente de coordinar procesos de desarrollo así como de disparar mecanismos de defensa contra enfermedades y otros estrés.

Finalmente, cabe mencionar que las algas del orden de las volvocales tienen paredes sin celulosa, hemicelulosa, pectinas y ligninas. Sus paredes están compuestas enteramente de glicoproteínas (Adair y Snell, 1990).



Plasmodesmas

La comunicación intercelular en plantas ocurre a través de puentes citoplásmicos llamados plasmodesmas (PD) (Lucas, 1995). Al contrario de lo que ocurre con las uniones tipo *gap*, que son grupos de proteínas que permiten el paso de iones y moléculas pequeñas de ~1,500 daltones directamente del interior de una célula animal a otra, los PD son estructuras elongadas que atraviesan la pared celular que rodea a la célula y establecen un continuo por el citoplasma y sistema endomembranal (retículo endoplásmico y membrana nuclear) a través de la mayor parte del cuerpo de la planta (figura 18-2). Cada PD existe como un canal citoplásmico intercelular dentro de la membrana plasmática. La región central del PD está ocupada por una forma comprimida de retículo endoplásmico (RE) que forma un continuo con el RE localizado en el citoplasma de la células adyacentes. El espacio entre el RE y la membrana plasmática, llamado el ánulo citoplásmico, es el que mantiene la continuidad del citoplasma. Hasta hace poco tiempo, se creía que la continuidad citoplásmica dada por los PD aumentaba la coordinación bioquímica y fisiológica entre los tejidos de la planta, permitiendo el paso libre de metabolitos pequeños y hormonas de menos de 1 kilodalton (kDa). Actualmente, evidencias recientes indican que los PD también presentan la capacidad de mediar transporte de proteínas y ácidos nucleicos de célula a célula de forma específica (Lucas, 1995). Interesantemente, un amplio rango de virus de plantas codifican proteínas de movimiento que tienen la capacidad de incrementar el tamaño límite de exclusión de los PD, unir ácidos nucleicos virales de manera no específica y mediar el transporte de éstos de célula a célula vía PD (Gilbertson y Lucas, 1996). El hallazgo de las proteínas de movimiento virales predijo la existencia de un sistema endógeno de movimiento de macromoléculas en plantas superio-

La comunicación intercelular en plantas ocurre a través de puentes citoplásmicos llamados plasmodesmas (PD).

Los PD son estructuras elongadas que atraviesan la pared celular que rodea a la célula y establecen un continuo por el citoplasma y sistema endomembranal (retículo endoplásmico y membrana nuclear) a través de la mayor parte del cuerpo de la planta.

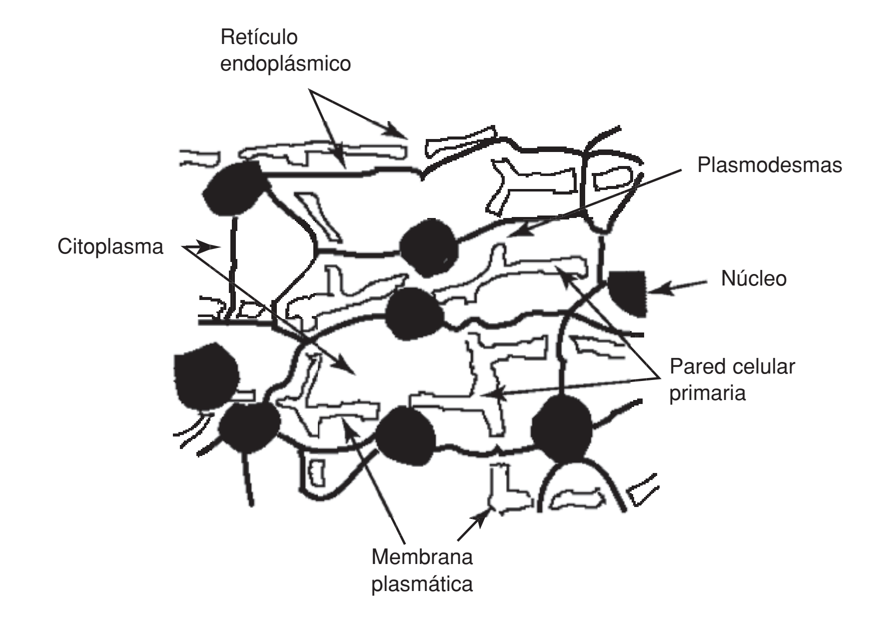


Figura 18-2. Ilustración esquemática de la membrana plasmática y el continuo citoplásmico y endomembranal creado como resultado de la formación de plasmodesmas a través de la pared celular. (Adaptada de Lucas, 1995.)

res. Esta hipótesis ha sido confirmada con un estudio reciente que muestra que el factor de transcripción KNOTTED-1 presenta características funcionales equivalentes a las de las proteínas de movimiento virales, con la excepción de que esta proteína muestra especificidad con respecto a movilizar únicamente su propio mRNA (Lucas y cols., 1995). De ahí que los PD sean estructuras dinámicas que pueden alterar sus dimensiones para así incrementar su capacidad de transporte, ya sea por contacto con virus o con proteínas endógenas de plantas.

> Los PD de plantas superiores pueden formarse por dos mecanismos diferentes.

Estudios de microscopia electrónica han establecido que los PD de plantas superiores pueden formarse por dos mecanismos diferentes. La formación de PD primarios está relacionada con el mecanismo de división celular y se lleva a cabo durante la producción de la placa celular. Durante la división celular, se produce una nueva pared celular mediante la coalescencia de vesículas en la placa celular. Una estructura llamada el fragmoplasto, que contiene microtúbulos orientados perpendicularmente a la placa celular en desarrollo, parece dirigir la formación de esta placa. La separación incompleta de las dos células hijas está acompañada por la posición controlada por el RE dentro y perpendicular a la placa celular en desarrollo. Mientras se desarrolla la nueva pared celular, este RE se llega a apresar y junto con la membrana plasmática que lo rodea forma los PD primarios. Los PD secundarios representan nuevos puentes citoplásmicos que se forman completa o parcialmente, poscitocinéticamente a través de la pared celular existente. Diversos estudios en gran variedad de especies vegetales y tejidos indican que los PD secundarios se forman *de novo*, o por la modificación de PD primarios preexistentes por un mecanismo desconocido. En plantas superiores, los PD secundarios se forman durante el desarrollo normal de hojas y raíces, entre cribas y células acompañantes, y entre células madre de polen. Además, también se forman a través de las uniones entre injertos, entre protoplastos fusionados y durante las interacciones huésped-parásito. La importancia de la función de los PD secundarios en el desarrollo de plantas ha sido reconocido recientemente (Lucas y cols., 1995).

Aunque la aparición de los PD está considerada como un suceso de máxima importancia en la evolución de las plantas superiores, poco se sabe sobre los procesos que dieron lugar a la evolución de este organelo intercelular. Específicamente, hay poca información sobre cuándo y dónde evolucionaron los mecanismos para la formación de PD primarios y secundarios. El conocimiento de estos procesos será crucial para el entendimiento de la evolución de formas y funciones complejas en las plantas.



La participación de la pared celular en el proceso de crecimiento

En esta sección nos referiremos al papel de la pared celular durante el crecimiento y la morfogénesis, particularmente durante la expansión celular, proceso que no sólo es responsable de la elongación de una célula, sino que también desempeña un papel importante durante la morfogénesis al modu-

lar la forma de una célula en crecimiento y, consecuentemente, definir la forma final de una planta.

Para que las células vegetales alcancen su estado funcional y su individualidad, es necesario que se elonguen. La coordinación entre la expansión y la diferenciación se lleva a cabo por alteraciones en la estructura de las paredes en desarrollo, las cuales están controladas por programas de desarrollo, o bien, como una reacción a cambios en las condiciones ambientales. El proceso de expansión se lleva a cabo, en gran parte, por un debilitamiento altamente controlado y selectivo de algunos componentes de la pared celular, de tal forma que le permite a la célula expanderse sin perder la integridad estructural de su pared.

Para que las células vegetales alcancen su estado funcional y su individualidad, es necesario que se elonguen.

Para que este proceso se dé se requiere de un mecanismo coordinado en el que participan la presión de turgencia, así como un rearreglo de la pared celular que involucra la degradación y síntesis de algunos de sus componentes. El ambiente acuoso que rodea a la célula vegetal consta de los líquidos contenidos en la pared celular. Aunque este líquido contiene más solutos que el medio exterior, es hipotónico en relación al citoplasma celular. Debido a este desequilibrio osmótico, se genera una presión hidrostática interna conocida como presión de turgencia la cual ejerce una fuerza, de adentro hacia fuera, contra la pared celular. Esta presión desaparece en el momento en que se da el equilibrio osmótico entre los ambientes intra- y extracelulares, de tal forma que ya no hay entrada neta de agua, a pesar de que persista una diferencia en las concentraciones de sales, entre el interior y el exterior. Para las plantas, la presión de turgencia es vital, ya que es una fuerza esencial para la expansión celular durante el proceso de crecimiento, además de proporcionar rigidez a los tejidos vegetales durante la vida de una planta. La presión de turgencia en una célula vegetal puede alcanzar valores tan altos (3 a 10 bar) que, de no ser por la estructura de la pared celular, las células reventarían. De hecho, la pared opone resistencia a la presión de turgencia generando una gran fuerza o tensión que, en células que están en crecimiento, está en el orden de 1,000 bar (Bolwell, 1993; Cosgrove, 1993a, b y c).

En contraste con estas características de rigidez y alta fuerza mecánica que presenta la pared celular, una relajación de la misma parece ser el suceso primario para que el proceso de elongación celular se inicie. Esta disminución en la tensión de la pared provoca que la presión de turgencia y el potencial hídrico también disminuyan y, consecuentemente, el agua empieza a fluir hacia la célula. Así pues, la elongación de la célula vegetal es el resultado de un mecanismo reversible, como lo es la toma de agua, y de uno irreversible que involucra la modificación selectiva de la pared, lo cual incluye no sólo síntesis de nueva pared, sino también una degradación previa de la misma (Cosgrove, 1993a y b).

Una hipótesis alternativa postula que la expansión celular se inicia con la toma de agua, la cual se induce por la acumulación de solutos, seguida por modificaciones de la pared que, a su vez, dan lugar a que se reduzcan la tensión en la pared y la presión de turgencia (Hettiaratchi y O'Callaghan, 1974). Sin embargo, en ambos modelos es posible apreciar que la naturaleza irreversible del proceso de expansión celular depende

de la característica intrínseca de la pared de relajarse a través de la ruptura específica de ciertas uniones entre algunos de sus componentes, lo cual permite el deslizamiento de polímeros y la posterior síntesis de nueva pared.

El componente que más contribuye a la fuerza de tensión de la pared es la celulosa.

El componente que más contribuye a la fuerza de tensión de la pared es la celulosa, ya que estas moléculas son capaces de interaccionar a través de puentes de hidrógeno y llegar a formar racimos o cables constituidos de 60 a 70 cadenas de celulosa con la misma polaridad. Estos largos agregados cristalinos, conocidos como microfibrillas de celulosa, también contribuyen, en buena medida, a la direccionalidad de la expansión, pues la futura morfología de una célula depende de la orientación de las microfibrillas de celulosa que se depositan en la pared (Alberts, y cols., 1994; Bolwell, 1993; Delmer y Amor, 1995). A diferencia de otros componentes de la pared celular, los cuales se sintetizan en el retículo endoplásmico o en el aparato de Golgi y posteriormente se secretan, la celulosa es sintetizada por un complejo enzimático que se encuentra unido a la membrana (la celulosa-sintetasa). Las cadenas nacientes de celulosa se ensamblan espontáneamente en microfibrillas, conforme se van sintetizando, para formar una cubierta extracelular, o lamela, sobre la membrana plasmática en la cual las microfibrillas conservan, más o menos, el mismo alineamiento. Cada lamela nueva se forma internamente con respecto a la anterior, de tal forma que la pared consiste en lamelas en un arreglo concéntrico, en donde la más vieja se encuentra más hacia el exterior (Bolwell, 1993; Delmer y Amor, 1995). En una célula en crecimiento, las microfibrillas más recientes se depositan perpendiculares al eje de elongación, aun cuando las microfibrillas anteriores se encuentren en diferente orientación. La orientación de las microfibrillas en las lamelas más internas (más nuevas) es la que determina la dirección de la expansión celular (Carpita y Gibeaut, 1993; Carpita y cols., 1996).

A diferencia de otros componentes de la pared celular, los cuales se sintetizan en el retículo endoplásmico o en el aparato de Golgi y posteriormente se secretan, la celulosa es sintetizada por un complejo enzimático que se encuentra unido a la membrana.

La coordinación entre la orientación en la colocación de las microfibrillas de celulosa y la direccionalidad de la expansión se da gracias a que los microtúbulos citoplásmicos se organizan en la corteza de la célula vegetal con la misma orientación que las microfibrillas. Estos microtúbulos corticales se encuentran muy cerca de la cara citoplásmica de la membrana plasmática y se mantienen en esa posición a través de su interacción con ciertas proteínas específicas. Sin embargo, aunque los microtúbulos no son necesarios para mantener la orientación de las microfibrillas, sí lo son para determinar una nueva orientación. Las células vegetales son capaces de cambiar su dirección de elongación y, por lo tanto, su plano de crecimiento y división, al modificar la orientación de los microtúbulos corticales; de tal forma que la morfología de una planta multicelular depende del control coordinado de la orientación de estos microtúbulos durante su desarrollo (Lloyd, 1982; McCann y cols., 1993; Wyatt y Carpita, 1993). Un proceso que ejemplifica la participación de la pared celular en la expansión celular se inicia en el cigoto cuando éste empieza a formar su nueva pared. Después de divisiones subsecuentes, la región apical de la pared celular se expande gradualmente hasta cubrir por completo el ápice de lo que será la región aérea. Puesto que la capa exterior de las células de la región aérea es una

capa relativamente autónoma, iniciará sus divisiones radiales o anticlinales hasta formar la epidermis que cubrirá a la planta en su estado maduro. La epidermis en el caso de un arbusto pudiera llegar a tener una superficie de aproximadamente 2 m^2, lo cual siginifica que la pared de la epidermis tuvo que haberse expandido por un factor de 10^{10}. Este proceso deja ver que la generación de nueva pared es una parte vital de la expansión celular (Cosgrove, 1993a-c; Knox, 1992).

Desde el descubrimiento de los reguladores de crecimiento, mucho del trabajo desarrollado hasta ahora se ha dirigido a la identificación del mecanismo que controla la expansión celular. Estudios que demuestran que las paredes primarias de muchas plantas, incluidas dicotiledóneas, monocotiledóneas, musgos y algas, se extienden o relajan cuando se encuentran en un medio ácido, inducido éste de manera exógena, o a través de la acción de la ATPasa de protones de la membrana plasmática, apoyan la hipótesis del "crecimiento ácido" (Cosgrove, 1993a, b y c; Hager y cols., 1991; Hettiaratchi y O'Callaghan, 1974; Labavitch y Ray, 1974; Rayle y Cleland, 1992). Esta hipótesis también ha sido aplicada al mecanismo de acción del inductor de crecimiento conocido como auxina, de tal forma que su efecto se explicaría por una inducción de la acidificación del medio, o bien, a través de la activación de enzimas relajadoras de la pared, previa acidificación de la zona en crecimiento. Aun cuando las bases fisiológicas de la teoría del "crecimiento ácido" se encuentran en debate, la mayoría de los fisiólogos vegetales consideran que enzimas tipo glicanohidrolasas se secretan o son activadas en sitios específicos de la pared celular, en donde llevan a cabo la función de romper la tensión generada por los enlaces entre los polisacáridos no celulósicos, los cuales, a su vez, forman los enlaces con las microfibrillas de celulosa (Carpita y Gibeaut, 1993; Rayle y Cleland, 1992; Taiz, 1984). Esta idea ha sido puesta en duda en fechas recientes por datos que indican que es posible la transglicosilación entre polímeros, y porque no se ha demostrado que ninguna de estas actividades enzimáticas induzcan una extensión prolongada en paredes aisladas, como ocurriría durante la elongación celular (Cosgrove, 1993a; McQueen-Mason y cols., 1993).

Recientemente, se han identificado dos proteínas asociadas a paredes celulares de pepino que son capaces de inducir la extensión de paredes aisladas. A estas proteínas se les han denominado "expansinas" por sus características funcionales (Cosgrove, 1993a; McQueen-Mason y cols., 1992; McQueen-Mason y Cosgrove, 1994). Puesto que la actividad óptima de estas proteínas se da a pH entre 4.5 y 5, se les ha considerado como los elementos mediadores del "crecimiento ácido". A diferencia de otros modelos que aluden a la hipótesis del crecimiento ácido, en el caso del modelo que involucra a las expansinas, la dependencia del pH reside en la actividad catalítica de estas proteínas y no en un efecto directo del pH sobre la estabilidad de los puentes de hidrógeno entre los polímeros de la pared. Al parecer, las expansinas extienden o relajan la pared a través de un mecanismo, poco usual, no hidrolítico capaz de romper las adhesiones no covalentes entre los polisacáridos de la pared celular y/o entre éstos y las microfibrillas de celulosa (Li y cols., 1993; McQueen-Mason y Cosgrove, 1994). En concordancia

con este mecanismo, se ha encontrado que las expansinas son capaces de debilitar el papel de la celulosa, el cual mantiene su fuerza mecánica gracias a los puentes de hidrógeno que se forman entre las fibras de celulosa que lo conforman (McQueen-Mason y Cosgrove, 1994). El reciente aislamiento y caracterización de los genes que codifican para este tipo de proteínas indica que pertenecen a una familia multigénica, altamente conservada. Este hecho sugiere que el mecanismo por el cual las expansinas promueven la extensión de la pared sólo tolera cambios pequeños en la estructura de estas proteínas. El análisis de la expresión de estos genes muestra que su transcrito es moderadamente abundante en la región de elongación del hipocótilo y éste no se detecta en la región de maduración, en concordancia con la función propuesta para las proteínas que codifican (Shcherban y cols., 1995).

Así pues, el hecho de que algunas enzimas como la transglicosilasa de endoxiloglucanos (TEX) y las glucanasas sean capaces de modificar o degradar la pared no es una evidencia de que induzcan expansión de la misma (Bolwell, 1993; Carpita y Gibeaut, 1993; Carpita y cols., 1996; Cosgrove, 1993b; De Silva y cols., 1993; Hetherington y Fry, 1993; Xu y cols., 1995). Estas actividades sin duda provocan una relajación en la pared que puede contribuir, por ejemplo, al ablandamiento en un fruto, pero no necesariamente a la elongación celular (Cosgrove, 1993c; De Silva y cols., 1994; Fanutti y cols., 1993; Fry y cols., 1992; Redgewell y Fry, 1993). Sin embargo, a la fecha no existe evidencia que permita descartar totalmente la posibilidad de que *in vivo* estas enzimas actúen de manera conjunta con las expansinas durante el proceso de crecimiento.

Durante el desarrollo de una planta las modificaciones en la pared son constantes.

Durante el desarrollo de una planta las modificaciones en la pared son constantes. Se dan procesos de relajación y expansión de la misma, así como cambios que generan paredes más rígidas. El incremento en la rigidez de la pared celular se ha asociado a un cese en el crecimiento. Es así que en respuesta a cierto tipo de señales que le indican a la célula que debe detener su elongación, la pared primaria "congela" su forma (Bolwell, 1993; Carpita y Gibeaut, 1993; Iraki y cols., 1989a y b; Keller, 1993; Nonami y Boyer, 1990; Taiz, 1984; Varner y Lin, 1989). Entre los componentes que se han involucrado en el mecanismo de paro o detención de la elongación se encuentran proteínas como las extensinas (Corbin, 1987; Esaka y cols., 1992; Neland, 1967), las PRP (Bradley y cols., 1992; Creelman y Mullet, 1991; Wyatt, 1992) y las GRP, entre otras (Carpita y Gibeaut, 1993; Keller, 1993; Showalter, 1993; Varner y Lin, 1989).

Como es el caso de un gran número de proteínas de pared, algunos miembros de las familias de las extensinas, PRP y GRP, son capaces de responder al ataque de patógenos y/o a la presencia de ciertos elicitores. Existe evidencia que demuestra que estas proteínas se insolubilizan rápidamente en la pared en respuesta al tratamiento con elicitores fúngicos. Se ha propuesto que estas proteínas interaccionan entre sí con las que forman uniones, entre ellas, que las inmovilizan. Estas observaciones han llevado a proponer la hipótesis de que estas proteínas se "congelan" en esta conformación, la pared se endurece y, de esta manera, podría resistir el ataque de patógenos y/o detener el crecimiento de la célula (Bradley y cols., 1992;

Corbin, 1987; Showalter, 1993). Este proceso de insolubilización puede ser inducido por peróxido de hidrógeno y quizás modulado por peroxidasas de la pared celular (Botella y cols., 1994). Aunque existe evidencia circunstancial, a la fecha no es posible afirmar que la insolubilización de estas proteínas desempeñe algún papel en la detención del crecimiento (revisado en: Carpita y Gibeaut, 1993; Keller, 1993; Showalter, 1993; Varner y Lin, 1989).



La interacción entre la pared celular y la membrana plasmática

En animales se ha demostrado que la interacción entre la matriz extracelular (MEC) y la membrana plasmática es un suceso esencial para procesos tales como la migración celular, la señalización transmembranal, la diferenciación, la morfogénesis, la respuesta a hormonas y factores de crecimiento, la comunicación intercelular, etc. Durante el desarrollo de un organismo, se han identificado diversos mecanismos que involucran este tipo de interacción y permiten que ciertas células encuentren sus caminos adecuados, o bien, se agreguen con las células apropiadas. Ejemplos de estas interacciones se dan entre ciertas glicoproteínas adhesivas, tales como las fibronectinas y vitronectinas, y receptores en la membrana conocidos como integrinas (Alberts y cols., 1994).

Dadas las diferencias estructurales entre la MEC vegetal y la animal, la relación entre la membrana plasmática de una célula vegetal y su MEC presenta características particulares. El hecho de que, en plantas, la MEC separe una célula de otra tiene como consecuencia que las interacciones se den a través de las matrices extracelulares de diferentes células y entre la membrana plasmática y la MEC de una misma célula. En muchos casos, de manera inevitable, las células vegetales se unen una con otra como consecuencia de la división celular, ya que, después de la citocinesis, dos células hermanas quedan adheridas. Con opción de una futura separación, la unión ocurre a través de una pared celular común, proveniente de la célula madre, y una lamela media compartida (figura 18-1) (Knox, 1992; Walbot y Holder, 1987).

Aunque en vegetales el proceso de migración celular no se presenta como en el caso de los animales, una célula puede alcanzar localizaciones lejanas por medio de una elongación dirigida (Lord y Sanders, 1992; Wyatt y Carpita, 1993; Zhu y cols., 1993). Un ejemplo típico de este comportamiento es la formación del tubo polínico durante el proceso de fertilización (Cheung, 1996; Dzelzkalns y cols., 1992; Lord y Sanders, 1992). El tubo polínico crece por expansión selectiva y puntual del grano de polen para viajar a lo largo del gineceo, en donde la MEC define la ruta que debe seguir para colocar las células espermáticas en el saco embrionario que se encuentra en el óvulo, al final del camino (Cheung, 1996; Lord y Sanders, 1992; Mascarenhas, 1993; Walbot y Holder, 1987). En años recientes se ha acumulado evidencia que indica que la MEC vegetal pudiera llevar a cabo funciones similares a las que se presentan en animales. Existe evidencia

El tubo polínico crece por expansión selectiva y puntual del grano de polen para viajar a lo largo del gineceo, en donde la MEC define la ruta que debe seguir para colocar las células espermáticas en el saco embrionario que se encuentra en el óvulo.

inmunológica que sugiere la presencia de "moléculas adhesivas a sustratos" en la MEC vegetal relacionadas a componentes de la MEC animal, como son la fibronectina y la vitronectina, ambas involucradas en procesos de reconocimiento y migración. Este tipo de moléculas han sido identificadas en raíces, hojas y tallos de diferentes especies de plantas superiores y se encuentran enriquecidas en las superficies de células que rodean el ducto estilar del gineceo (Knox, 1992; Sanders y cols., 1991; Wagner y Mathysse, 1992; Wang y cols., 1994; Wyatt y Carpita, 1993; Zhu y cols., 1993). De acuerdo con estos resultados, se ha comunicado la purificación de un receptor de una proteína relacionada a vitronectina, a partir de cultivos en suspensión de células de soya (Metcalf y cols., 1983; Schindler y cols., 1989).

Observaciones realizadas en células de tabaco, adaptadas a crecer en altas concentraciones de cloruro de sodio, sugieren la presencia de complejos de adhesión capaces de mantener una unión firme entre la membrana plasmática y la MEC. De acuerdo a los datos de estos informes, este tipo de complejos se encuentran enriquecidos en células adaptadas a estrés osmótico. El análisis inmunológico de las proteínas de la MEC de células de tabaco mostró la presencia de proteínas relacionadas a vitronectina, las cuales se encontraron más enriquecidas en las células adaptadas a condiciones hiperosmóticas que en las que no se adaptaron. Así mismo, se encontraron proteínas relacionadas inmunológicamente a fibronectina en la MEC de células adaptadas pero no se detectó señal en las que no se adaptaron. Estas proteínas parecieran estar asociadas con procesos de adhesión entre la membrana plasmática y la MEC, los cuales son inducibles en condiciones en donde existe una limitación de crecimiento (Zhu y cols., 1993). A pesar de estas observaciones, las evidencias relacionadas con la presencia de proteínas tipo vitronectinas o fibronectinas, así como su función, son de carácter circunstancial.

> Durante el desarrollo de una planta, la posición de una célula en relación al resto de las células en una población de células meristemáticas es un factor importante para determinar el destino de la misma.

Durante el desarrollo de una planta, la posición de una célula en relación al resto de las células en una población de células meristemáticas es un factor importante para determinar el destino de la misma: la célula necesita saber si tiene vecinas y quiénes son. Cualesquiera que sean los mecanismos de señalización, el contacto entre las células de un meristemo o en el embrión resulta ser un requisito para establecer las distinciones entre las células en los tiempos adecuados. Pareciera ser que, una vez que estas distinciones han sido establecidas, se da una relajación gradual del contacto intercelular, la cual se encuentra regulada durante el desarrollo. Esto puede notarse en tejidos ya diferenciados, como los tejidos parenquimatosos del córtex o la médula, los cuales consisten en células relativamente grandes, con espacios intercelulares extensos. Así pues, la estrategia de regeneración que siguen las plantas por la cual las células del parénquima, o cualquier otro tipo de células diferenciadas, se pueden convertir en células meristemáticas, involucra el reestablecimiento de grupos de células adheridas fuertemente como preludio o, de forma concurrente, a la iniciación de la organogénesis (Brownlee y Berger, 1995; Carpita y cols., 1996; Knox, 1992; Kreuger y Van Holst, 1993; Wyatt y Carpita, 1993). Resulta fácil imaginar que componentes de la MEC participen activamente

en esta dinámica de comunicación. Se han identificado algunas moléculas en la MEC de células meristemáticas, algunas de las cuales son glicoproteínas que presentan una expresión diferencial a lo largo de la embriogénesis que reflejan cambios en adherencia y morfología. El hecho de que estas moléculas se localicen en la cara exterior de la membrana plasmática sugieren fuertemente que las interacciones entre la membrana y la MEC representan una forma de enviar señales de una célula a otra a través de sus componentes extracelulares. La identificación de diferentes moléculas de este tipo ha sido importante para la generación de marcadores que permitan dilucidar los mecanismos por los cuales las células vegetales adquieren cierta forma de identidad y son capaces de interpretar su posición de la manera correcta (Knox y cols., 1991; Knox, 1992; Kreuger y Van Holst, 1993; Fincher y cols., 1983; Pont-Lezica y cols., 1993; Pruitt y cols., 1993).



La interacción entre la MEC y la membrana plasmática como un mecanismo de respuesta celular a los cambios ambientales

Diferentes condiciones de estrés ambiental inducen cambios en la composición de la MEC vegetal que incluyen modificaciones tanto en la composición de carbohidratos como en la de proteínas. Estos cambios han sido relacionados con diferencias en el volumen de diversos tipos celulares, o bien, con la generación de moléculas señalizadoras, conocidas como oligosacarinas, las cuales pueden actuar como inhibidores o inductores del crecimiento (Carpita y cols., 1996; Creelman y Mullet, 1991; Covarrubias y cols., 1995; Esaka y cols., 1992; Fry y cols., 1993; Iraki y cols., 1989a y b; McCann y cols., 1994; Showalter, 1993).

De particular interés resulta la respuesta de las células vegetales, o células con pared, cuando se exponen a cambios osmóticos. Si una célula vegetal se transfiere a un medio hipertónico, el agua tiende a salir de la célula, lo cual provoca la pérdida de turgencia. Una vez que la célula ha perdido suficiente agua, se presenta plasmólisis y la membrana plasmática se separa de la rígida MEC vegetal. Algunos estudios realizados con cultivos de células en suspensión de tabaco han mostrado que las células de tabaco, después de adaptarse a estrés osmótico, muestran una adhesión excepcionalmente fuerte entre su membrana plasmática y su MEC. Cuando se aíslan protoplastos de estas células adaptadas, éstos mantienen sus características adhesivas y se adhieren unos con otros. Esta capacidad de adhesión se puede inhibir por la adición de ciertos péptidos específicos en cuya secuencia se incluye un dominio (Arg-Gly-Asp = RGD) conservado en diferentes proteínas de la MEC animal (Zhu y cols., 1993). Aunque este fenómeno de adhesión pudiera poseer determinantes múltiples, estos resultados sugieren que este incremento en la adhesión en células adaptadas está mediado, al menos en parte, por un sistema homólogo al caracterizado en animales entre receptores en la membrana (integrinas) y componentes de la MEC (vitronectina, fibronectina, laminina, etc.). El uso de anticuerpos policlonales dirigidos contra

vitronectina y fibronectina humanas permitió identificar proteínas relacionadas en la membrana y la MEC de células de tabaco, particularmente enriquecidas en aquellas células adaptadas al estrés osmótico (Wyatt y Carpita, 1993; Zhu y cols., 1993).

Además de este tipo de proteínas, se han identificado otras glicoproteínas, asociadas a MEC, las cuales también presentan características adhesivas y, sin embargo, no están relacionadas antigénicamente con la vitronectina o fibronectina de animales. Algunas de estas proteínas también se acumulan en respuesta al estrés osmótico en diferentes tejidos vegetales (Covarrubias y cols., 1995; Fincher y cols., 1983; Knox, 1992; Metcalf y cols., 1983; Pont-Lezica y cols., 1993). Datos notificados en la literatura apuntan a qué proteínas de las conocidas como tipo extensinas están implicadas en interacciones con el citoesqueleto a través de componentes de la membrana plasmática. Así, por ejemplo, se ha demostrado que es posible proteger la desorganización de los microtúbulos de protoplastos de tabaco, inducida con tratamientos de bajas temperaturas, por la adición de extensina (Akashi y Shibaoka, 1991; Ertl y cols., 1992; Goldman y cols., 1992; Kieliszewski y Lamport, 1994; Lind y cols., 1994; Rubinstein y cols., 1995a y b).

Aún se desconoce si la acumulación de estas proteínas está relacionada con el proceso de adaptación al estrés osmótico, o si es el resultado de alteraciones en la fisiología del crecimiento de las células adaptadas. A pesar de que en las células adaptadas a estrés osmótico hay un incremento en la presión de turgencia, la expansión celular está inhibida (Zhu y cols., 1993). Así pues, se ha propuesto que los complejos integrinas-MEC pudieran percibir cambios de turgencia, transmitir estos cambios hacia el interior de la célula a través de la red del citoesqueleto y disparar así otros procesos bioquímicos que regulan la división celular y el crecimiento (o cambios en el volumen celular). También se ha planteado la hipótesis de que este sistema de adhesión es capaz de señalizar los cambios osmóticos en el ambiente de tal forma que la célula puede responder con un ajuste osmótico apropiado (Pont-Lezica y cols., 1993; Wyatt y Carpita, 1993; Zhu y cols., 1993). Con estas ideas en mente se propone que esta interacción entre la membrana plasmática y la MEC provee de un mecanismo de tolerancia al estrés osmótico al evitar cambios importantes en el volumen del protoplasto vegetal. Este sistema de adhesión sería capaz de minimizar la ruptura celular durante situaciones en las cuales la disponibilidad de agua provoque una plasmólisis parcial y de esta manera, cuando ocurre la rehidratación, se promueve la restauración ordenada de las funciones celulares.



La función de la MEC y sus interacciones durante el proceso de fertilización

En plantas que florean, los granos de polen (el gametofito masculino) interaccionan con diferentes tejidos y células en el pistilo (el órgano reproductivo femenino) para llevar a cabo una reproducción sexual exitosa. La

polinización se inicia con el depósito del polen sobre la papila de la superficie estigmática. Los granos de polen se hidratan y germinan, es decir, emiten una prolongación o tubo polínico, el cual penetra la cutícula de las células papilares del estigma e invade la MEC de las células secretoras. Una vez que entran en el estilo, los tubos polínicos se confinan al tracto transmisor central y, en el caso de plantas con estilos rellenos o sólidos, el tubo se elonga por la MEC de las células transmisoras que llenan el estilo; en tanto que, en el caso de las plantas con estilos huecos, el tubo crece a lo largo de la superficie y en el mucílago del canal transmisor. Para que la fertilización ocurra, cada tubo polínico entra en la parte inferior del ovario, por el micropilo, para lo cual tiene que cambiar su dirección de crecimiento. El tubo polínico sigue un camino del estigma al óvulo, totalmente a través de la MEC, para penetrar en el saco embrionario. Las interacciones más significativas para mantener el crecimiento del tubo polínico y para establecer la orientación del mismo son aquellas que se dan entre el polen y la MEC del pistilo (Cheung, 1996; Dzelzkalns y cols., 1992; Lord y Sanders, 1992; Mascarenhas, 1993; Pruitt y cols., 1993; Sanders y Lord, 1992). Puesto que las regiones citosólicas al frente del tubo polínico son competentes para una posterior elongación y fertilización, esto es, pueden funcionar independientemente del tubo que se ha quedado atrás, se puede considerar que la elongación del tubo polínico es una forma única de migración celular en vegetales (Jauh y Lord, 1995).

Por mucho tiempo, el medio del tejido transmisor del estilo se consideró como un medio que proporcionaba nutrientes para el crecimiento del tubo polínico. Esta hipótesis fue complementada por datos que demostraron el movimiento activo de partículas de látex a lo largo de la MEC estilar (Sanders y Lord, 1989). Estos resultados sugirieron una participación activa del tejido transmisor en el estilo durante la extensión del polen, a través de un mecanismo de adhesión y reconocimiento entre las matrices extracelulares de las diferentes células.

El tejido transmisor posee una MEC relativamente heterogénea. Esta matriz está enriquecida con azúcares libres, polisacáridos, proteínas glicosiladas y lípidos. Durante la polinización, se ha observado que el contenido de carbohidratos de la MEC disminuye y que los amiloplastos del tejido transmisor desaparecen. Es, por esta demanda metabólica evidente y significativa durante el crecimiento del tubo polínico, que se cree que el tejido transmisor proporciona nutrientes para este proceso. Las proteínas presentes en la MEC del tejido transmisor incluyen una colección de diferentes glicoproteínas: AGP, PRP, otras proteínas tipo vitronectina, etc. Mientras que algunas de estas proteínas desempeñan un papel estructural en las paredes celulares del tejido transmisor, otras pudieran participar directamente en el proceso de crecimiento del tubo polínico. Debido al alto contenido de azúcares y a la adhesividad características de las AGP se les han atribuido funciones de reconocimiento y adhesión durante la polinización y se les ha llegado a considerar como moléculas capaces de proporcionar nutrientes y una superficie adhesiva durante el crecimiento del tubo polínico (Cheung y cols., 1995; Cheung, 1996; Fincher y cols., 1983; Lord y Sanders, 1992). Una de estas proteínas, denominada TTS (del inglés, *transmitting tissue-specific*,

específica del tejido transmisor) se ha demostrado que es importante para el crecimiento del tubo polínico. La proteína TTS es capaz de estimular *in vitro* el crecimiento del polen y, cuando se proporciona a distancia, atrae a los tubos polínicos (Cheung y cols., 1995). Experimentos *in vitro* demuestran que, cuando proteínas TTS se adicionan a cultivos de tubos polínicos, éstas se desglicosilan y se incorporan a las paredes del tubo en elongación. Estas observaciones son concordantes con la idea de que las proteínas TTS también funcionan como una fuente de nutrientes para el crecimiento del tubo polínico (Cheung y cols., 1995; Cheung, 1996; Wu y cols., 1995).

En cuanto a las señales que dirigen el crecimiento, es posible que éstas se encuentren en múltiples sitios a lo largo del tejido transmisor. Estas señales pudieran ser incluso de diferentes tipos, estructurales, bioquímicas y, posiblemente, también eléctricas (Cheung, 1996). Estudios en esta dirección con las proteínas TTS muestran que éstas se encuentran más glicosiladas en el extremo cercano al ovario que en el cercano al estigma. Esto indica que las proteínas TTS presentan un gradiente de glicosilación que coincide con la dirección de crecimiento del tubo polínico, lo cual le impone a la proteína TTS una función de guía en este proceso de migración (Wu y cols., 1995). Muchas otras glicoproteínas de MEC están presentes en el tejido transmisor a lo largo de la ruta de elongación del tubo polínico, así como en la pared del tubo polínico mismo, de tal forma que es probable que múltiples proteínas participen con funciones similares y redundantes para hacer de este proceso un proceso exitoso (Bedinger y cols., 1994; Cheung, 1996; Rubinstein y cols., 1995a y b).

Conclusiones

Los componentes de la pared celular son más complejos de lo que anticipábamos. Esta complejidad al parecer es necesaria, pues no ha sido eliminada por el proceso evolutivo. De ahí que nuestra tarea sea la identificación de los componentes de la pared de todos los tipos de células, la determinación de la estructura de estas moléculas, el aislamiento de los genes responsables de estos componentes y, finalmente, el poder ensamblar estas moléculas en una pared funcional de una célula en particular.

Las múltiples funciones de la MEC vegetal en diferentes procesos relevantes para la vida vegetal hacen de este organelo un elemento atractivo de estudio. La participación de la MEC en procesos tales como el crecimiento ha sido estudiada por décadas, sin embargo, a la fecha aún existe confusión y falta de definición en la función de los diferentes componentes de la MEC. Algo similar se podría mencionar para otros procesos tales como la fertilización, la comunicación intra- e intercelular, la respuesta a estrés bióticos y abióticos, etc. Así pues, resulta evidente la importancia de continuar el estudio de la MEC, a pesar de su complejidad. Sin duda, éste representa un reto para ser abordado con diferentes enfoques conceptuales y herramientas metodológicas.



Referencias bibliográficas

Adair, W.S. y Snell, W.J., "The *Chlamydomonas reinhardtii* cell wall: Structure, biochemistry, and molecular biology", en *Organization and Assembly of Plant and Animal Extracellular Matrix*, Adar, W.S. y Mecham, R.P., eds., Academic Press, Nueva York, 15-84, 1990.

Ahn, J.H.; Choi, Y.; Kwon, Y.M.; Kim, S.G.; Choi, Y.D. y Lee, J.S., "A novel extensin gene encoding a hydroxyproline-rich glycoprotein requires sucrose for its wound-inducible expression in transgenic plants", *Plant Cell,* **8:** 1477-1490, 1996.

Akashi, T.; Kawasaki, S. y Shibaoka, H., "Stabilization of cortical microtubules by the cell wall in cultured tobacco cells: effects of extensin on the cold-stability of cortical microtubules", *Plant,* **182:** 363-369, 1990.

——— y Shibaoka, H., "Involvement of transmembrane proteins in the association of cortical microtubules with plasma membrane in tobacco BY-2 cells", *J. Cell Sci.,* **98:** 169-174, 1991.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J.D., "The Molecular Biology of the Cell", Garland Publishing Inc., Nueva York, 1994.

Averyhart-Fullard, V.; Datta, K. y Marcus, A., "A hydroxyproline-rich protein in the soybean cell wall", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **85:** 1082-1085, 1988.

Bacic, A.; Churms, S.C. y Stephen, A.M., "Fine structure of the arabinogalactan-protein from *Lolium multiflorum*", *Carbohydr. Res.,* **162:** 85-94, 1987.

Bao, W.; O'Malley, D.M. y Sederoff, R.R., "Wood contains a cell-wall structural protein", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **89:** 6604-6608, 1992.

Bedinger, P.A.; Hardeman, K.J. y Loukides, C.A., "Traveling in style: the cell biology of pollen", *Trends Cell Biol.,* **4**: 132-138, 1994.

Bolwell, G.P., "Dynamic aspects of the plant extracellular matrix", *Int. Rev. Cytol.,* **146:** 261-324, 1993.

Botella, M.A; Quesada, M.A.; Konowicz, A.K.; Bressan, R.A.; Pliego, F.; Hasegawa, P.M. y Valpuesta, V., "Characterization and *in situ* localization of a salt-induced tomato peroxidase mRNA", *Plant Mol. Biol.,* **25:** 105-114, 1994.

Bradley, D.J.; Kjellbom, P. y Lamb, C.J., "Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich cell wall protein: a novel, rapid defense response", *Cell,* **70:** 21-30, 1992.

Braun, D.M. y Walker, J.C., "Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle", *Trends Biochem. Sci.,* **21:** 70-73, 1996.

Brown, R.M.; Saxena, I.M. y Kudlicka, K., "Cellulose biosynthesis in higher plants", *Trends in Plant Science,* **1:** 149-156, 1996.

Brownlee, C. y Berger, F., "Extracellular matrix and pattern in plant embryos: on the lookout for developmental information", *Trends Genet.,* **11:** 344-348, 1995.

Carpita, N.; McCann, M. y Griffing, L.R., "The plant extracellular matrix: news from the cell's frontier", *Plant Cell,* **8:** 1451-1463, 1996.

Carpita, N.C. y Gibeaut, D.M., "Structure models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth", *Plant J.,* **3:** 1-30, 1993.

Carraro, L.; Lombardo, G. y Gerola, F.M., "Stylar peroxidase and incompatibility reactions in *Petunia hybrida*", *J. Cell Sci.,* **82:** 1-10, 1986.

Cassab, G.I., "Arabinogalactan proteins during the development of soybean root nodules", *Plant,* **168:** 441-446, 1986.

——— y Varner, J.E., "Immunolocalization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing onto nitrocellulose paper", *J. Cell Biol.,* **105:** 2581-2588, 1987.

———— y Varner, J.E., "Cell wall proteins", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.,* **39:** 321-353, 1988.

Chen, J. y Varner, J.E., "Isolation and characterization of cDNA clones for carrot extensin and a proline-rich 33-kDa protein", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **82:** 4399-4403, 1985.

Cheung, A.Y., "Pollen-pistil interactions during pollen-tube growth", *Trends Plant Sci.,* **1:** 45-51, 1996.

————; Wang, H. y Hu, W., "A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth", *Cell,* **82:** 383-393, 1995.

Condit, C.M.; McClean, B.G. y Meagher, R.B., "Characterization of the expression of the petunia glycine-rich protein-1 gene product", *Plant Physiol.,* **93:** 596-602, 1990.

———— y Meagher, R.B., "A gene encoding a novel glycine-rich protein of petunia", *Nature,* 178-181, 1986.

Corbin, D.R., "Differential regulation of a hydroxyproline rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants", *Mol. Cell Biol.,* **7:** 4337-4344, 1987.

Cosgrove, D.J., "Wall extensibility: its nature, measurement and relationship to plant cell growth", *New Phytol.,* **124:** 1-23, 1993a.

————, "How do plant cell walls extend?", *Plant Physiol.,* **102:** 1-6, 1993b.

————, "Water uptake by growing cells: an assesment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake, and hydraulic conductance", *Int. J. Plant Sci.,* **154:** 10-21, 1993c.

Covarrubias, A.A.; Ayala, J.W.; Reyes, J.L.; Hernandez, M. y Garciarrubio, A., "Cell-wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings", *Plant Physiol.,* **107:** 1119-1128, 1995.

Creelman, R.A. y Mullet, J., "Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of differentially expressed cDNAs, a new β-Tubulin gene, and expression of genes enconding cell wall proteins", *Plant Mol. Biol.,* **17:** 591-608, 1991.

Crétin, C. y Puigdomènech, P., "Glycine-rich RNA-binding proteins from *Sorghum vulgare*", *Plant Mol. Biol.,* **15:** 783-785, 1990.

Datta, K. y Marcus, A., "Nucleotide sequence of a gene encoding soybean repetitive proline-rich protein 3", *Plant Mol. Biol.,* **14:** 285-286, 1990.

De Oliveira, D.E.; Seurinck, J.; Inzé, D.; Van Montagu, M. y Botterman, J., "Differential expression of five Arabidopsis genes encoding glycine-rich proteins", *Plant Cell,* **2:** 427-436, 1990.

De Silva, J.; Arrowsmith, D.; Hellyer, A.; Whiteman, S. y Robinson, S., "Xyloglucan endotransglycosylase and plant growth", *J. Exp. Bot.,* **45:** 1693-1701, 1994.

————; Jarman, C.D.; Arrowsmith, D.A.; Stronach, M.S.; Chengappa, S.; Sidebottom, C. y Reid, J.S.G., "Molecular characterization of a xyloglucan-specific endo-(1-4)-β-D-glucanasa (xyloglucan *endo*-transglycosylase) from *Nasturatium* seeds", *Plant J.,* **3:** 701-711, 1993.

Della Penna, D.; Alexander, D.C. y Bennet, A.B., "Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonases: analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **83:** 6420-6424, 1986.

Delmer, D.P. y Amor, Y., "Cellulose biosynthesis", *Plant Cell,* **7:** 987-1000, 1995.

Dey, P.M. y Campillo, E.D., "Biochemistry of the multiple forms of glycosidases in plants", *Adv. Enzymol.,* **56:** 141-249, 1984.

Didierjean, L.; Frendo, P. y Burkard, G., "Stress responses in maize: Sequence analysis of cDNAs encoding glycine-rich proteins", *Plant Mol. Biol.,* **18:** 847-849, 1992.

Dzelzkalns, V.A.; Nasrallah, J.B. y Nasrallah, M.E., "Cell-cell communication in plants: self-incompatibility in flower development", *Dev. Biol.,* **153:** 70-82, 1992.

Epstein, L. y Lamport, D.T.A., "An intramolecular linkage involving isodityrosine in extensin", *Phytochemistry,* **23:** 1241-1246, 1984.

Ertl, H.; Hallmann, A.; Wenzl, S. y Sumper, M., "A novel extensin that may organize extracellular matrix biogenesis in *Volvox carteri", Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **11:** 2055-2062, 1992.

Esaka, M.; Hayakawa, H.; Hashimoto, M. y Matsubara, N., "Specific and abundant secretion of a novel hydroxyproline-rich glycoprotein from salt-adapted winged bean cells", *Plant Phys.,* **100:** 1339-1345, 1992.

Everdeen, D.S.; Kiefer, S.; Willard, J.J.; Muldoon, E.P.; Dey, P.M.; Li, X.B. y Lamport, D.T.A., "Enzymic cross-linkage of monomeric extensin precursors *in vitro*", *Plant Physiol.,* **87:** 616-621, 1988.

Fanutti, C.; Gidley, M.J. y Reid, J.S.G., "Action of a pure xyloglucan endotransglycosylase (formerly called xyloglucan-specific endo-(1-4)-β-D-glucanasa) from the cotyledons of germinated *Nasturatium* seeds", *Plant J.,* **3:** 691-700, 1993.

Fincher, G.B.; Stone, B.A. y Clarke, A.E., "Arabinogalactan-proteins: Structure, biosynthesis, and function", *Annu. Rev. Plant Physiol.,* **34:** 47-70, 1983.

Fong, C.; Kieliszewski, M.J.; de Zacks, R.; Leykam, J.F. y Lamport, D.T.A., "A gymnosperm extensin contains the serine-tetrahydroxyproline motif", *Plant Physiol.,* **99:** 548-552, 1992.

Franssen, H.J.; Nap, J.P.; Gloudemans, T.; Stiekema, W.; Van Dam, H.; Govers, F.; Louwerse, J.; Van Kammen, A. y Bisseling, T., "Characterization of cDNA for nodulin-75 of soybean: A gene product involved in early stages of root nodule development", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **84:** 4495-4499, 1987.

Freshour, G.; Clay, R.P.; Fuller, M.S.; Albersheim, P.; Darvill, A.G. y Hahn, M.G., "Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots", *Plant Physiol.,* **110:** 1413-1429, 1996.

Fry, S.C., "Oligosaccharin mutants", *Trends in Plant Science,* **1:** 326-328, 1996.

———; Aldington, S.; Hetherington, P.R. y Aitken, J., "Oligasaccharides as signals and substrates in the plant cell wall", *Plant Physiol.,* **103:** 1-5, 1993.

———; Smith, R.C.; Renwick, K.F.; Martin, D.J.; Hodge, S.K. y Matthews, K.J., "Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosenning enzyme activity from plants", *Biochem. J.,* **282:** 821-828, 1992.

Gilbertson, R.L. y Lucas, W.J., "How do viruses traffic on the 'vascular highway'?", *Trends in Plant Sciences,* **1:** 260-268, 1996.

Gleeson, P.A.; McNamara, M.; Wettenhall, E.H.; Stone, B.A. y Fincher, G.B., "Characterization of the hydroxyproline-rich protein core of an arabinogalactan-protein secreted from suspension-cultured *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) endosperm cells", *Biochem. J.,* **264:** 857-862, 1989.

Godoy, J.A.; Pardo, J.M. y Pintor-Toro, J.A., "A tomato cDNA inducible by salt stress and abscisic acid: Nucleotide sequence and expression pattern", *Plant Mol. Biol.,* **15:** 695-705, 1990.

Goldman, M.H.S.; Pezzotti, M.; Seurinck, J. y Mariani, C., "Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like proteins", *Plant Cell,* **4:** 1041-1051, 1992.

Gómez, J.; Sánchez-Martínez, D.; Stifel, V.; Rigau, J.; Puigdomènech, P. y Pagès, M., "A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein", *Nature,* **334:** 262-264, 1988.

Govers, F.; Harmsen, H.; Heidstra, R.; Michielsen, P.; Prins, M.; Van Kammen, A. y Bisseling, T., "Characterization of the pea ENOD12B gene and expression analysis of the two ENOD12 genes in nodule, stem and flower", *Mol. Gen. Genet.,* **228:** 160-166, 1991.

Granell, A.; Peretó, J.G.; Schindler, U. y Cashmore, A.R., "Nuclear factors binding to the extensin promoter exhibit defferential activity in carrot protoplasts and cells", *Plant Mol. Biol.,* **18:** 739-748, 1992.

Hager, A.; Debus, G.; Edel, H.G.; Stransky, H. y Serrano, R., "Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H+-ATPase", *Plant,* **185:** 527-537, 1991.

Hayashi, T.; Marsden, M.P.F. y Delmer, D.P., "Pea xyloglucan and cellulose. V. Xyloglucan-cellulose internactions *in vitro* and *in vivo*", *Plant Physiol,* **83:** 384-389, 1987.

He, Z.H.; Fujiki, M. y Kohorn, B.D., "A cell-wall associated, receptor-like protein kinase", *J. Biol. Chem.,* **271:** 19789-19793, 1996.

Hetherington, P.R. y Fry, S.C., "Xyloglucan endotransglycosylase activity in carrot cell suspensions during cell elongation and somatic embryogenesis", *Plant Physiol.,* **103:** 987-992, 1993.

Hettiaratchi, D.R.P. y O'Callaghan, J.R., "A membrane model of plant cell extension", *J. Theoretical Biology,* 1974.

Holdsworth, M.J. y Laties, G.G., "Site-specific binding of a nuclear factor to the carrot extensin gene is influenced by both ethylene and wounding", *Plant,* **179:** 17-23, 1989a.

————, "Identification of a wound-inducible inhibitor of a nuclear factor that binds the carrot extensin gene", *Plant,* **180:** 74081, 1989b.

Hong, J.C.; Nagao, R.T. y Key, J.L., "Developmentally regulated expression of soybean proline-rich cell wall protein genes", *Plant Cell,* **1:** 937-943, 1989.

———— y Key, J.L., "Characterization of a proline-rich cell wall protein gene family of soybean", *J. Biol. Chem.,* **265(5):** 2470-2475, 1990.

Hu, H. y Brown, P.H., "Localization of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin", *Plant Physiol.,* **105:** 681-689, 1994.

Iraki, N.M.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M. y Carpita, N.C., "Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth limited plant cells adapted to osmotic stress", *Plant Physiol.,* **91:** 39-42, 1989a.

————; Singh, N.; Bressan, R.A. y Carpita, N.C., "Cell walls of tobacco cells and changes in composition associated with reduced growth upon adaptation to water and saline stress", *Plant Physiol.,* **91:** 48-53, 1989b.

Jauh, G.Y. y Lord, E.M., "Movement of the pollen tube cell in the lily style in the absence of the pollen grain and the spent pollen tube", *Sex Plant Reprod.,* **8:** 168-172, 1995.

José-Estanyol, M.; Ruíz-Avila, L. y Puigdomènech, P., "A maize embryo-specific gene encodes a proline-rich and hydrophobic protein", *Plant Cell,* **4:** 413-423, 1992.

Kaldenhoff, R. y Richter, G., "Sequence of a cDNA for a novel light-induced glycine-rich protein", *Nucl. Acids Res.,* **17:** 2853, 1989.

Kaplan, D.R. y Hageman, W., "The mutationship of cell and organism in vacuolar plants", *BioScience,* **41:** 693-703, 1991.

Keegstra, K.; Talmadge, K.W.; Bauer, W.D. y Albersheim, P., "The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components", *Plant Physiol.,* **51:** 188-196, 1973.

Keller, B., "Structural cell wall proteins", *Plant Physiol.,* **101:** 1127-1130, 1993.

———— ; Sauer, N. y Lamb, C.J., "Glycine-rich cell wall proteins in bean: Gene structure and association of the protein with the vascular system", *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **7:** 3625-3633, 1988.

———— ; Templeton, M.D. y Lamb, C.J., "Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **86:** 1529-1533, 1989.

Kieliswеski, M.J.; Kamyab, A.; Leykham, J.F. y Lamport, D.T.A., "A repetitive proline-rich protein from the gymnosperm Douglas fir is a hydroxyproline-rich glycoprotein", *Plant Physiol.,* **98:** 919-926, 1992.

———— ; Leykam, J.F. y Lamport, D.T.A., "Structure of the threonine-rich extensin from Zea mays", *Plant Physiol.,* **92:** 316-326, 1990.

———— y Lamport, D.T.A., "Extensin: repetitive motifs functional sites, post-translational codes, and phylogeny", *Plant J.,* **5:** 157-172, 1994.

Kleis-San Francisco, S.M. y Tierney, M.L., "Isolation and characterization of a proline-rich cell wall protein from soybean seedlings", *Plant Physiol.,* **94:** 1897-1902, 1990.

Knox, J.P., "Cell adhesion, cell separation and plant morphogenesis", *Plant J.,* **2:** 137-141, 1992.

———— ; Linstead, P.J.; King, J.; Cooper, C. y Roberts, K., "Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation", *Plant J.,* **1:** 317-326, 1991.

Kobayashi, M.; Matoh, T. y Azuma, J., "Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls", *Plant Physiol.,* **110:** 1017-1020, 1996.

Kreuger, M. y Van Holst, G.J., "Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L", *Plant,* **189:** 243-248, 1993.

Labavitch, J.M. y Ray, P.M., "Relationship between promotion of xyloglucan metabolism and induction of elongation by indolacetic acid", *Plant Physiol.,* **54:** 499-502, 1974.

Lei, M. y Wu, R., "A novel glycine-rich cell wall protein gene in rice", *Plant Mol. Biol.,* **16:** 187-198, 1991.

Levy, S. y Staehelin, L.A., "Synthesis, assembly and function of plant cell wall macromolecules", *Curr. Opinion Cell Biol.,* **5:** 856-862, 1992.

Li, Z.C.; Durachko, D.M. y Cosgrove, D.J., "An oat coleoptile wall protein that induces wall extension *in vitro* and that is antigenically related to similar protein from cucumber hypocotyls", *Plant,* **191:** 349-356, 1993.

Lind, J.L.; Bacic, A.; Clarke, A.E. y Anderson, M.A., "A style-specific hydroxyproline-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan proteins", *Plant J.,* **6:** 491-502, 1994.

Lindstrom, J.T. y Vodkin, L.O., "A soybean cell wall protein is affected by seed color genotype", *Plant Cell,* **3:** 561-571, 1991.

Lloyd, C.W., "The cytoskeleton" en *Plant growth and development,* Academic Press, Nueva York, 1982.

Loomis, W.D. y Durst, R.W., "Chemistry and biology of boron", *BioFactors,* **3:** 229-239, 1992.

Lord, E.M. y Sanders, L.C., "Roles of the extracellular matrix in plant development and pollination: a special case of cell movement in plants", *Dev. Biol.,* **153:** 16-28, 1992.

Lucas, W., "Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants", *Curr. Opin. Cell Biol.,* **7:** 673-689, 1995.

Lucas, W.J.; Bouché-Pillon, S.; Jackson, D.P.; Nguyen, L.; Baker, L.; Ding, B. y Hake, S., "Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata", *Science,* **270:** 1980-1983, 1995.

Mascarenhas, J.P., "Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation", *Plant Cell,* **5:** 1303-1314, 1993.

McCann, M.C.; Shi, J.; Roberts, K. y Carpita, N.C., "Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells", *Plant J.,* **5:** 773-785, 1994.

———— ; Stacey, N.J.; Wilson, N. y Roberts, K., "Orientation of macromolecules in the walls of elongating carrot cells", *J. Cell Sci.,* **106:** 1347-1356, 1993.

McNeil, M.; Darvill, A.; Fry, S.C. y Albersheim, P., "Structure and function of plant of the primary cell walls of plants", *Annu. Rev. Biochem.,* **53:** 625-663, 1984.

McQueen-Mason, S.; Durachko, D.M. y Cosgrove, D.J., "Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants", *The Plant Cell,* **4:** 1425-1433, 1992.

———— y Cosgrove, D.J., "Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **91:** 6574-6578, 1994.

————, S.J.; Fry, S.C.; Durachko, D.M. y Cosgrove, D.J., "The relationship between xyloglucan endotransglycosylase in *in vitro* cell wall extension in cucumber hypocotyls", *Plant,* **190:** 327-331, 1993.

Metcalf, T.N.; Wang, J.L.; Schubert, K.R. y Schindler, M., "Lectin receptors on the plasma membrane of soybean cells, binding and lateral diffusion of lectins", *Biochemistry,* **22:** 3969-3975, 1983.

Moore, P.J. y Staehelin, L.A., "Immunogold localization of the cell wall matrix polisaccharides rhamnogalacturonan-I and xyloglucan durin cell expansion and cytokinesis in *Trifolium pratense* L", *Plant,* **174:** 433-445, 1988.

Müller, J.; Boller, T. y Wiemken, A., "Trehalose and trehalase in plants: recent developments", *Plant Science,* **112:** 1-9, 1995.

Mundy, J. y Chua, N.H., "Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene", *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **7:** 2279-2286, 1988.

Nagafuchi, T., "Mechanism of adhesion of polyphenolic protein and its potential for clinical application", *J. Jpn. Orthop. Assoc.,* **66:** 1176-1183, 1992.

Neland, "A possible role of hydroxyproline containing proteins in the cessation of cell elongation", *Plant Physiol.,* **42:** 669-671, 1967.

Nonami, H. y Boyer, J.S., "Wall extensibility and cell wall hydraulic conductivity decrease in enlarging stems tissues at low water potentials", *Plant Physiol.,* **93:** 39-47, 1990.

Norman, P.M.; Kjellbom, P.; Bradley, D.J.; Hahn, M.G. y Lamb, C.J., "Immunoaffinity purification and biochemical characterization of plasma membrane arabinogalactan-rich-glycoproteins of *Nicotiana glutinosa*", *Plant,* **181:** 365-373, 1990.

Pennel, R.I.; Knox, J.P.; Scofield, G.N.; Selvendran, R.R. y Roberts, K., "A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants", *J. Cell. Biol.,* **108:** 1967-1977, 1989.

Pont-Lezica, R.F.; McNally, J.G. y Pickard, B.G., "Wall-to-membrane linkers in onion epidermis: some hypotheses", *Plant, Cell and Environ.,* **16:** 111-123, 1993.

Pruitt, R.E.; Hulskamp, M.; Kopczak, P.S.E. y Schneitz, K., "Molecular genetics of cell interactions in *Arabidopsis*", *Development Suppl.,* 77-84, 1993.

Qi, X.; Behrens, B.X.; West, P.R. y Mort, A.J., "Solubilization and partial characterization of extensin fragments from cell walls of cotton suspension cultures", *Plant Physiol.,* **108:** 1691-1701, 1995.

Rayle, D.L. y Cleland, R.E., "The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well", *Plant Physiol.,* **99:** 1271-1274, 1992.

Redgewell, R.J. y Fry, S.C., "Xyloglucan endotransglycosylase activity increases during kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*) ripening: implications for fruit softening", *Plant Physiol.,* **103:** 1399-1406, 1993.

Rohde, W.; Rosch, K.; Kröger, K. y Salamini, F., "Nucleotide sequence of a *Hordeum* vulgare gene encoding a glycine-rich protein with homology to vertebrate cytokeratins", *Plant Mol. Biol.,* **14:** 1057-1059, 1990.

Rubinstein, A.L.; Broadwaterm, A.H.; Lowrey, K.B. y Bedinger, P.A., "*Pex1*, a pollen-specific gene with an extensin-like domain", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **92:** 3086-3090, 1995.

———— ; Marquez, J.; Suarez-Cervera, M. y Bedinger, P.A., "Extensin-like glycoproteins in the maize pollen tube wall", *Plant Cell,* **7:** 2211-2225, 1995.

Sanders, L.C.; Wang, C.S.; Walling, L.L. y Lord, E.M., "A homolog of the substrate adhesion molecule vitronectin occurs in four species of flowering plants", *Plant Cell,* **3:** 629-635, 1991.

———— y Lord, E.M., "Directed movement of latex particles in the gynoecia of three species of flowering plants", *Science,* **243:** 1606-1608, 1989.

———— y Lord, E.M., "A dynamic role for the stylar matrix in pollen tube extension", *Intl. Rev. Cytol.,* **140:** 297-318, 1992.

Scheres, B.; Van de Wiel, C.; Zalensky, A.; Horvath, B.; Spaink, H.; Van Eck, H.; Zwartkruis, F.; Wolters, A.M.; Gloudemans, T.; Van Kammen, A. y Bisseling, T., "The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction", *Cell,* **60:** 281-294, 1990.

Schindler, M.; Meiners, S. y Cheresh, D.A., "RGD-dependent linkage between plant cell wall and plasma membrane: consequences for growth", *J. Cell Biol.,* **108:** 1955-1965, 1989.

Shcherban, T.Y.; Shi, J.; Durachko, D.M.; Guiltinan, M.J.; McQueen-Mason, S.J.; Shieh, M. y Cosgrove, D.J., "Molecular cloning and sequence analysis of expansins -a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **92:** 9245-9249, 1995.

Sheng, J.; D'Ovidio, R. y Mehdy, M.C., "Negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding", *Plant J.,* **1:** 345-354, 1991.

Showalter, A.M., A.M., "Structure and function of plant cell wall proteins", *Plant Cell,* **5:** 9-23, 1993.

———— ; Zhou, J.; Rumeau, D.; Worst, S.G. y Varner, J.E., "Tomato extensin and extensin-like cDNAs: Structure and expression in response to wounding", *Plant Mol. Biol.,* **16:** 547-565, 1991.

Smith, J.J.; Muldoon, E.P.; Willard, K.J. y Lamport, D.T.A., "Tomato extensin precursors P1 and P2 are highly periodic structures", *Phytochemistry,* **25:** 1021-1030, 1986.

Stiefel, V.; Ruiz-Avila; Raz, R.; Vallés, M.P.; Gómez, J.; Pagés, M.; Martínez-Izquierdo, J.A.; Ludevid, M.D.; Langdale, J.A.; Nelson, T. y Puigdomènech, P., "Expression of a maize cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in early leaf and root vascular diferentiation", *Plant Cell,* **2:** 785-793, 1990.

Sturm, A., "A wound-inducible glycine-rich protein from *Daucus carota* with homology to single-stranded nucleic acid-binding proteins", *Plant Physiol.,* **99:** 1689-1692, 1992.

Taiz, L., "Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties", *Ann. Rev. Plant Physiol.,* **35:** 585-657, 1984.

Thibault, J.F. y Rinaudo, M., "Chain association of pectic molecules during calcium-induced gelation", *Biopolymers,* **25:** 455-468, 1986.

Tieman, D.M.; Harriman, R.W.; Ramanohan, G. y Handa, A.K., "An antisesne pectin methylsterase alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit", *Plant Cell,* **4:** 667-670, 1992.

Tierney, M.L.; Wiechert, J. y Pluymers, D., "Analysis of the expression of extensin and p33-related cell wall proteins in carrot and soybean", *Mol. Gen. Genet.,* **211:** 393-399, 1988.

Van de Wiel, C.; Scheres, B.; Franssesn, H.; Van Lierop, M.J.; Van Lammeren, A.; Van Kammen, A. y Bisseling, T., "The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules", *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **9:** 1-7, 1990.

Van Holst, G.J. y Clarke, A.E., "Organ-specific arabinogalactan-proteins of *Lycopersicon peruvianum* (Mill) demonstrated by crossed electrophoresis", *Plant Physiol.,* **80:** 786-789, 1986.

Van Kan, J.A.L.; Cornelissen, B.J.C. y Bol, J.F., "A virus-inducible tobacco gene encoding a glycine-rich protein shares putative regulatory elements with the ribulose biphosphate carboxylase small subunit gene", *Mol. Plant-Microbe Interc.,* **1:** 107-112, 1988.

Varner, J.E. y Cassab, G.I., "A new protein in petunia", *Nature,* **323:** 110, 1986.

——— y Lin, L.S., "Plant cell wall architecture", *Cell,* **56:** 231-239, 1989.

——— y Taylor, R., "New ways to look at the architecture of plant cell walls", *Plant Physiol.,* **91:** 31-33, 1989.

Wagner, V.T. y Mathysse, A.G., "Involvement of a vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells", *J. Bacteriol.,* **174:** 5999-6003, 1992.

Waite, J.H., "The formation of mussel byssus: anatomy of a natural manufacturing process", *R. Results Probl. Cell Differ.,* **19:** 55-74, 1992.

Walbot, V. y Holder, N., Developmental Biology. *In Editor,* ed. Series Random House, Nueva York, 1987.

Wang, C.S.; Walling, L.L.; Gu, Y.Q.; Ware, C.F. y Lord, E.M., "Two classes of proteins and mRNAs in *Lilium longiflorum* L. identified by human vitronectin probes", *Plant Physiol.,* **104:** 711-717, 1994.

Wingate, V.P.M.; Lawton, M.A. y Lamb, C.J., "Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes", *Plant Physiol.,* **87:** 206-210, 1988.

Woesner, J.P. y Goodenough, U.W., "Molecular characterization of a zygote wall protein: An extensin-like molecule in *Chlamydomonas reinhardtii*", *Plant Cell,* **1:** 99-110, 1989.

Wu, H.; Wang, H. y Cheung, A.Y., "A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower", *Cell,* **82:** 395-403, 1995.

Wyatt, R.E., "Patterns of soybean proline-rich protein gene expression", *Plant Cell,* **4:** 99-110, 1992.

Wyatt, S.E. y Carpita, N.C., "The plant cytoskeleton-cell-wall continuum", *Trends Cell Biol.,* **3:** 413-417, 1993.

Xu, W.; Purugganan, M.M.; Polisensky, D.H.; Antosiewicz, D.M.; Fry, S.C. y Braam, J., "*Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase", *Plant Cell,* **7:** 1555-1567, 1995.

Yamaoka, T. y Chiba, N., "Changes in the coagulation ability of pectin during growth of soybean hypocotyls", *Plant Cell Physiol.,* **24:** 1281-1290, 1983.

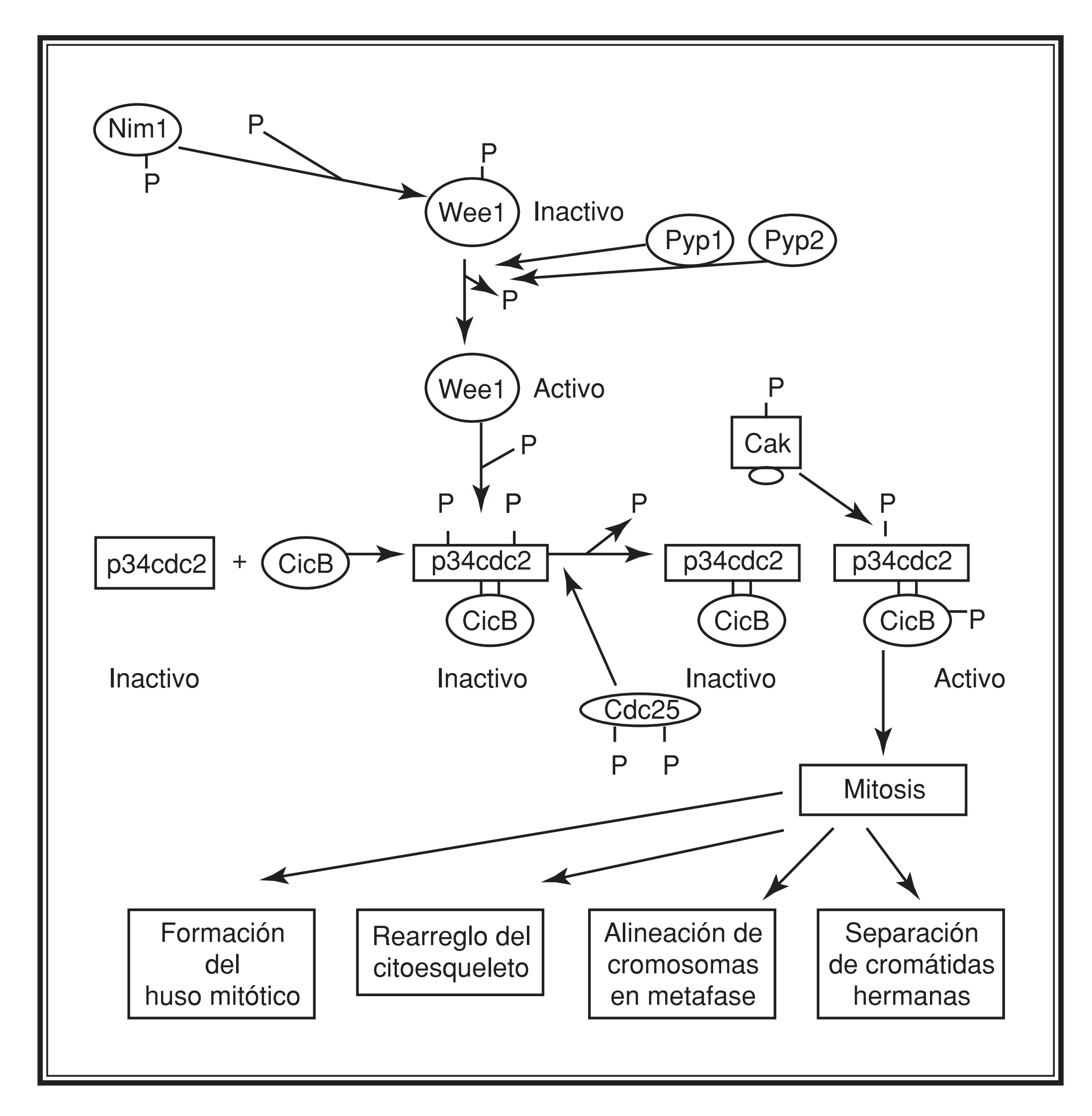
Ye, Z.H.; Song, Y.R.; Marcus, A. y Varner, J.E., "Comparative localization of three classes of cell wall proteins", *Plant J.,* **1:** 175-183, 1991.

Zheng, H.Y., "Comparative localization of three classes of cell wall proteins", *Plant J.,* **1:** 175-183, 1991.

Zhu, J.K.; Shi, J.; Singh, U.; Wyatt, S.E.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M. y Carpita, N.C., "Enrichment of vitronectin- and fibronectin-like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion", *Plant J.,* **3:** 637-646, 1993.

Parte IV

Reproducción y muerte celular



Principales procesos regulatorios durante la transición G2-mitosis.

CAPÍTULO 19

EL CICLO CELULAR

Jorge Manuel Vázquez Ramos



Introducción

Todos los seres vivos, uni- y pluricelulares tienen como misión fundamental la de reproducirse, preservando sus características esenciales a través de las generaciones. Al reproducirse, las células de los diferentes organismos tendrán que asegurar que todo su material se reparta en forma aproximadamente equitativa entre las células hijas resultantes. No obstante, existe una molécula que tendrá que ser duplicada exactamente, el ácido desoxirribonucleico o DNA, la molécula encargada de definir a los diferentes organismos y la responsable de la herencia. Los acontecimientos que ocurren durante la reproducción celular están comprendidos dentro del proceso conocido como ciclo celular, el cual está determinado por cinco fases diferentes, las que aseguran que el DNA se duplique, o fase S (síntesis), se reparta exactamente entre dos núcleos, o fase M (mitosis), y que dichos núcleos posteriormente formen parte de dos células diferentes al repartirse el material celular y dividirse la célula madre, o citocinesis. Las dos fases restantes, llamadas G1 y G2 (*gap*, espacio o hueco) anteceden a las fases de síntesis y de mitosis, respectivamente, y son fases donde ocurren múltiples procesos regulatorios propios del ciclo celular.

> El ciclo celular, está determinado por cinco fases diferentes, conocidas como G1, S, G2, M y citocinesis.

Considerado únicamente desde el punto de vista metabólico, el ciclo celular podría definirse como una sucesión de interfase y mitosis; en la primera ocurren todos los procesos metabólicos y regulatorios necesarios para la ordenada progresión del ciclo, mientras que en la mitosis se dan fundamentalmente los rearreglos estructurales, tanto citoplásmicos como nucleares, que permitirán la repartición exacta del material genético.

El ciclo celular no es un solo proceso metabólico, sino la resultante de la coordinación de varios procesos, los que podrían en sí mismos constituir ciclos: el ciclo cromosomal que consiste en la duplicación del DNA, su condensación, segregación y posterior descondensación, involucrando la síntesis y el ensamblaje de las proteínas que forman parte de los cromosomas; el ensamblaje y desensamblaje de la envoltura nuclear; la polimerización y despolimerización de microtúbulos al formar el huso mitótico y su

posterior desensamblaje; la reproducción, migración y reparto de organelos, y varios otros. Evidentemente, la síntesis y acumulación de ácido ribonucleico (RNA) y proteínas durante el ciclo deberá también integrarse al continuo de procesos para coordinar el tamaño celular con el avance del ciclo.

La gran interrogante ha sido el entender cómo es que se logra coordinar toda esta serie de sucesos en el tiempo. Esta pregunta está siendo contestada con el descubrimiento de la participación de los procesos de fosforilación y desfosforilación de proteínas en la regulación del metabolismo, del ciclo celular en particular, de tal forma que el estado de fosforilación de proteínas clave regulará su actividad, localización o ensamblaje.

Estudios iniciales

Quizás los experimentos de Rao y Johnson, a finales de la década de 1960 y principios de la de 1970, aportaron los primeros datos sobre la existencia de moléculas que influían en el desarrollo del ciclo celular (Johnson y Rao, 1970; Rao y Johnson, 1970). Usando cultivos sincronizados de células humanas, en experimentos de fusión celular, encontraron que la fusión de células bloqueadas en mitosis con células en interfase, ya fuera en G1, S o G2, les provocaba a éstas una condensación cromosomal prematura, característica propia de células en mitosis; lo anterior evidenciaba la existencia de factores celulares que provocaban la entrada a mitosis, presentes sólo en células en esta etapa. Los mismos autores describieron la existencia de un factor promotor de la fase S (o SPF), al lograr que células en G1 entraran prematuramente a S, al fusionarlas con células sincronizadas en la fase S, pero no con células sincronizadas en G2.

Aproximadamente al mismo tiempo, el grupo de Masui notificaba que los oocitos inmaduros de rana, que naturalmente detienen su desarrollo en la interfase G2/M de la meiosis I, eran inducidos a madurar, esto es, a progresar hasta la metafase de la meiosis II, por progesterona (Masui y Markert, 1971). En esta etapa, los huevos estaban preparados para ser fertilizados. Si, en lugar de progesterona, los oocitos eran tratados con extractos proteicos provenientes de huevos maduros, detenidos en metafase (en meiosis II), el resultado era la maduración de los oocitos. Los experimentos anteriores indicaron sobre la existencia de un factor promotor de la maduración, o MPF. Experimentos posteriores, efectuados en células de anfibios, humanos e invertebrados marinos, entre otras especies, demostraron a su vez la existencia de factores de promoción de la mitosis, los que también podían promover la maduración de oocitos de rana; por lo tanto, la distinción entre factor promotor de la maduración y factor promotor de la fase M, se volvió puramente nominal.

El desarrollo de un sistema de experimentación más sencillo, que utilizaba extractos celulares de huevos de anfibio (*Xenopus laevis)*, hizo posible la purificación del MPF (Lohka y cols., 1988). En estos ensayos se podían fácilmente seguir los cambios en la dinámica microtubular y condensación cromosomal propios de la entrada de las células a la fase M, al añadir frac-

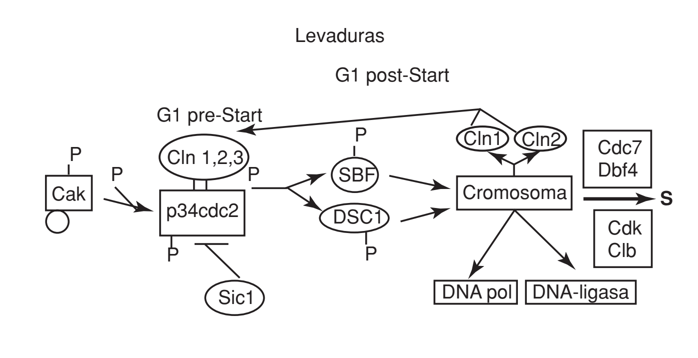
cionados proteicos de huevos de *Xenopus laevis*. La purificación a homogeneidad de MPF mostró la presencia de dos proteínas de 45 y 32 kDa.

El trabajo genético en levaduras durante la década de 1970 ofreció también una serie de evidencias sobre genes involucrados en el desarrollo del ciclo celular y su control. En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* se identificó un gen, llamado *cdc*2[1] (*cell division cycle* 2), cuyo producto era requerido en dos puntos del ciclo celular, en G1 y en G2 (Nurse y Bisset, 1981). Algunas mutantes de *cdc*2 provocaban que las células entraran a mitosis con anticipación, causando un fenotipo de células pequeñas. Genes semejantes se encontraron poco después en la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* y en células humanas, al rescatar mutantes de *cdc*2 de *S. pombe* con DNA tanto de *S. cerevisiae* como de humano (Beach y cols., 1982). En el caso de la levadura, el gen fue nombrado *cdc*28. La existencia de genes conservados en especies filogenéticamente alejadas como lo son las levaduras de fisión, las de gemación y las células humanas, fue muy sugerente de mecanismos regulatorios de la entrada a mitosis conservados durante la evolución. El gen *cdc*2, como se le conoce universalmente, se encontró que codificaba para una proteína de 34 kDa con actividad de cinasa sobre histona H1 (Simanis y Nurse, 1986).

El trabajo genético en levaduras durante la década de 1970 ofreció una serie de evidencias sobre genes involucrados en el desarrollo del ciclo celular y su control.

El producto de expresión del gen *cdc*2 (*cell division cycle* 2), es requerido en dos puntos del ciclo celular: G1 y G2.

El gen *cdc*2 codifica para una proteína de 34 kDa con actividad de cinasa sobre histona H1.



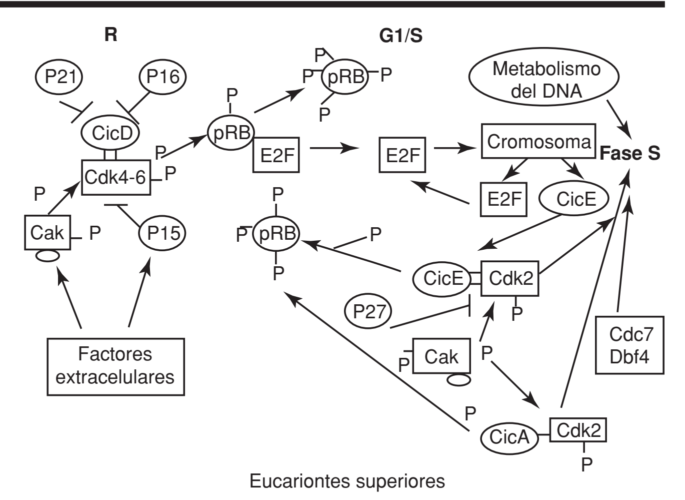


Figura 19-1. Aspectos del mecanismo de control de la transición G1/S en eucariontes.

[1]Se escribe el término en minúscula y cursiva cuando se trata del gen (por ejemplo: *cdc2*) y con mayúscula inicial se refiere a la proteína producto del gen (por ejemplo: Cdc2).

La entrada a mitosis en células de anfibios y animales marinos se correlaciona con la activación de una cinasa de histona H1.

La entrada a mitosis en células de anfibios y animales marinos se correlacionaba con la activación de una cinasa de histona H1. Esta cinasa fue purificada de células de estrella de mar, encontrando que uno de sus componentes era una proteína de 34 kDa. Una actividad similar se encontró en diferentes tipos de eucariontes.

El desarrollo de un anticuerpo contra el producto del gen *cdc*2 de *S. pombe*, produjo resultados muy reveladores: una proteína de 34 kDa era reconocida tanto en *S. pombe* como en MPF de anfibios y humanos, así como en la cinasa de histona H1-dependiente de la fase M de varias especies de eucariontes. El resultado fue más sorprendente cuando se relacionó el hecho de que *cdc2* era una proteína-cinasa que se activaba durante el ciclo celular y que MPF purificado de *Xenopus* mostraba también actividad de cinasa sobre histona H1 (Simanis y Nurse, 1986; Lohka y cols., 1988). La conclusión fue que MPF representaba la forma mitótica de la cinasa *cdc2* y que *cdc2* era la cinasa de histona H1 específica de la fase M.

Algunas proteínas que se sintetizan gradualmente durante interfase en invertebrados marinos y se degradaban abruptamente en mitosis son el producto de expresión de los genes de ciclinas.

El comportamiento de algunas proteínas que se sintetizaban gradualmente durante interfase en invertebrados marinos y se degradaban abruptamente en mitosis también causó curiosidad (Evans y cols., 1982). Esta cíclica acumulación de proteínas se correlacionaba con la activación y desactivación de MPF. Los genes para estas proteínas, llamadas ciclinas, se clonaron primero en invertebrados marinos, correspondiendo a dos proteínas: ciclina A y ciclina B. Las secuencias genéticas revelaron regiones conservadas y con homología al producto del gen *cdc*13 de *S. pombe*. Anteriormente se había demostrado, por experimentos genéticos, que los productos de *cdc*13 y *cdc*2 interactuaban específicamente en la transición G2/M. La homología existente entre *cdc*13 y las ciclinas sugirió entonces que *cdc2* podría interaccionar con las ciclinas. La primera evidencia de la interacción se dio en invertebrados marinos, cuando se demostró que *cdc2* interactuaba tanto con ciclina A, como con ciclina B, y en ambos complejos se detectaba actividad de cinasa sobre histona H1 en mitosis, mas no en interfase. Anticuerpos contra la ciclina B identificaban a la proteína de 45 kDa previamente detectada en MPF de rana. MPF era la cinasa de histona H1 de la fase M, compuesta de la proteína de 34 kDa producto del gen *cdc*2 y de la proteína ciclina, producto del gen *cdc*13 en *S. pombe*, o bien de los genes de ciclinas A o B de eucariontes superiores.



La proteína p34cdc2. Actividad y regulación

El producto del gen *cdc*2 de *S. pombe* es una proteína de 34 kDa denominada p34cdc2.

El producto del gen *cdc*2 de *S. pombe* es una proteína de 34 kDa denominada p34cdc2; es una proteína de 297 aminoácidos con sitio para unión a ATP y que se modifica por fosforilación (Simanis y Nurse, 1986). La complementación de mutantes en *cdc*2 de *S. pombe* con DNA de *S. cerevisiae* permitió reconocer que el gen *cdc*28 es homólogo a *cdc*2, con una identidad de 62%; el gen equivalente de humanos también fue clonado de esta manera y mostró una identidad de 63%. Genes homólogos han sido descritos para insectos, aves, mamíferos, anfibios, protozoarios y plantas, y anticuerpos contra la proteína de levadura reconocen bandas de tamaño similar en todos los casos.

La proteína p34cdc2 de todas las especies eucariontes estudiadas presenta varios sitios de fosforilación, equivalentes todos ellos, y que se han definido como treonina 14 (tre14), tirosina 15 (tir15) y treonina 167 (tre167), de acuerdo a la posición que ocupan en levaduras de fisión, aunque los sitios pueden variar ligeramente en posición. Algunas serinas pueden también ser fosforiladas (Norbury y Nurse, 1992).

La proteína p34cdc2 de todas las especies eucariontes estudiadas presenta varios sitios de fosforilación.

La p34cdc2 es una cinasa de Ser-Tre, cuya actividad se regula tanto por fosforilación como por su asociación con otras proteínas, en particular las ciclinas (Moreno y cols., 1989). La unión de p34cdc2 con ciclinas tipo A o B es fundamental para que se dé la activación de la cinasa que permitirá a las células la entrada a la fase M. No se ha atribuido actividad enzimática alguna a las ciclinas.

En levaduras de fisión, mutaciones en el gen *cdc*2 mostraban comportamientos diversos: detención tanto en G1 como en G2 en mutantes letales termosensibles, o bien entrada prematura a la fase M en mutantes con actividad de cinasa constitutiva, o de "ganancia de función", dando un fenotipo *wee* (de células o colonias pequeñas). Estas segundas mutaciones proporcionaron evidencia importante en el entendimiento del mecanismo de regulación de la actividad de p34cdc2, ya que se demostraba que había ocurrido una sustitución de la Tir15 por otro aminoácido no fosforilable. La implicación era que la fosforilación de Tir 15 constituía un suceso regulatorio negativo, para detener o retrasar la mitosis. Tir15 se encuentra dentro del dominio de unión a nucleótidos de la proteína, probablemente inhibiendo así su actividad de cinasa. Mutaciones en p34cdc2 en las que se sustituía a Tre14 por otro aminoácido no fosforilable también interferían con la actividad de la cinasa.

Los estudios genéticos indicaban que el gen *cdc*2 interactuaba, además de con el gen *cdc*13 descrito anteriormente, con otros genes como *wee*1, *mik*1, *cdc*25, *nim*1 y *suc*1 (Russell y Nurse, 1987). Los productos de *wee*1 y *mik*1 parecían interferir negativamente, mientras que *cdc*25 y *nim*1 parecían activar la función de *cdc*2 (Moreno y cols., 1990). Las secuencias de *wee*1, *nim*1 y *mik*1 indicaban que se trataba de proteín-cinasas, mientras que la secuencia de *cdc*25 demostraba la presencia de una proteín-fosfatasa. Aún no es evidente cuál es la función del producto de *suc*1.

La evidencia experimental ha demostrado la interacción física entre los productos de los diferentes genes y la forma en que se regularía la actividad de la cinasa p34cdc2 durante la transición G2/mitosis.

La proteína Wee1 es un inhibidor de mitosis dosis-dependiente. Su mutación causa la entrada prematura de las células a mitosis, provocando el fenotipo de células (o colonias) pequeñas antes descrito para mutaciones en *cdc*2; por otra parte, su sobreproducción promueve detención de la entrada a mitosis. Es una proteína de una masa molecular de 107 kDa, presente en bajas concentraciones en las células y con actividad de cinasa de serina-tirosina (cinasa dual) (Parker y cols., 1992). Experimentos *in vivo* e *in vitro* han mostrado que Wee1 fosforila a p34cdc2 en la tirosina 15, inhibiendo su actividad de cinasa, aunque esto ocurre sólo si p34cdc2 se encuentra asociada a ciclinas; sin embargo, las mutantes en *wee*1 no son letales. Por otra parte, las dobles mutantes *wee*1-*mik*1 son letales hipermitóticas (no con-

trolan el tiempo de entrada a mitosis) por lo que se ha sugerido que sus productos actúan en forma complementaria (Lundgren y cols., 1991). *Mik*1 posee una masa de 66 kDa y tiene también características de cinasa dual (Ser, Tir).

Mutaciones en el gen *cdc*25 mostraban un fenotipo de células alargadas, detenidas en G2, el cual podía suprimirse si se inhibía la actividad de Wee1. El producto del gen *cdc*25 es una proteína de 80 kDa cuya secuencia denota débilmente la presencia de una proteín-fosfatasa (Millar y cols., 1991). En realidad, se trata de una nueva forma de fosfatasa dual de serina y tirosina. La función de Cdc25 es antagonista a la de Wee1, lo que originalmente sugirió que actuaba para remover fosfatos agregados por la cinasa Wee1. Se ha demostrado tanto *in vivo*, como *in vitro* que Cdc25 tiene como blanco a la fosfotirosina 15 de p34cdc2; de esta manera se explica por qué la sobreproducción de Cdc25 estimulaba a la entrada prematura a mitosis y también el que las mutaciones en que la fosfatasa no era funcional provocaran la detención del ciclo en G2/M.

La proteína Wee1 puede encontrarse también como una fosfoproteína, en cuyo caso pierde la actividad de cinasa sobre p34cdc2. Es, por lo tanto, una proteína regulable por fosforilación y tendrá que haber la cinasa que la regula negativamente y la fosfatasa que la active.

La Nim1 es una cinasa de tirosina-serina con masa de 67 kDa, cuya actividad es inductora de mitosis.

La Nim1 es una cinasa de tirosina-serina con masa de 67 kDa, cuya actividad es inductora de mitosis: su sobreexpresión produce entrada prematura a mitosis y puede suprimir mutaciones en *cdc*25, pero no en *cdc*2. El blanco de Nim1 es Wee1, a la que fosforila en varias regiones, reduciendo notablemente su actividad de cinasa (Wu y Russell, 1993); de esta manera, Wee1 deja de actuar sobre p34cdc2, la que ahora podrá ser desfosforilada y activada. La regulación positiva de Wee1 está dada por la acción de fosfatasas y los productos genéticos de *pyp*1 y *pyp*2 (fosfatasas de tirosina) podrían ser los encargados de activar a Wee1 en su función de represor de mitosis (Ottilie y cols., 1992), aunque esto no ha sido totalmente demostrado.

La activacion de p34cdc2 como cinasa también depende de su asociación con el producto del gen *cdc*13, o ciclina B. Ésta es una proteína de 56 kDa sin actividad catalítica demostrada (Booher y cols., 1988). En mutantes en las que el gen *cdc*13 se ha perdido o interrumpido, se detiene el ciclo celular en G2 con cromosomas descondensados y no existe actividad de la cinasa p34cdc2 (Booher y cols., 1989). La asociación física entre ciclina B y p34cdc2 ha sido claramente demostrada en experimentos de inmunoprecipitación, ya que anticuerpos contra cualquiera de las dos proteínas precipitan también a la proteína contraparte. El par p34cdc2-ciclina B equivale al MPF de eucariontes superiores.

La secuencia proteica de la ciclina B no muestra una clara señal de internación a núcleo, aunque se ha notificado que la localización de ciclina B es tanto citoplásmica como nuclear (Pines y Hunter, 1991). Se ha demostrado que en la secuencia proteica de la ciclina B1 de *Xenopus* existen tanto una "señal de retención en citoplasma", como una "señal de exportación del núcleo", lo que implica un mecanismo de control que incluye una constante entrada y salida del núcleo, regulable por el estado de fosforilación de la proteína (Li y cols., 1997; Hagting y cols., 1998). A diferencia de p34cdc2,

que es una proteína relativamente estable durante el ciclo celular, la ciclina B es sintetizada durante la fase S para alcanzar un máximo cerca del punto de transición G2/M, tiempo en que también ocurre la activación de p34cdc2 como cinasa. Aunque originalmente se había especulado que dicha activación se alcanzaba cuando la cantidad de ciclina B llegaba a un mínimo requerido, experimentos posteriores demostraron que dicho umbral podía alcanzarse, y aun rebasarse, sin que se incrementara la actividad de cinasa, por lo que otros elementos de control debían estar participando en la activación de la cinasa.

Dado que la proteína p34cdc2 no tiene una secuencia evidente de internación a núcleo, pero que su localización durante la mitosis es claramente nuclear, se ha propuesto que una de las funciones de la ciclina B es lograr que p34cdc2 penetre al núcleo, mediante la formación del complejo (Booher y cols., 1989). Evidencia adicional también ha mostrado que los principales procesos regulatorios sobre p34cdc2, esto es, su fosforilación o desfosforilación de residuos específicos, se da sólo si la cinasa está unida a la ciclina.

Igualmente importante para la activación de la cinasa es su fosforilación en la treonina 161. Ésta ocurre una vez que se ha unido a ciclina B y la enzima que lo efectúa es la cinasa activadora de Cdks o Cak. En eucariontes superiores, esta enzima es también un complejo de una cinasa Cdk7 y de una ciclina, la ciclina H; la actividad de cinasa de este complejo, a diferencia de los otros complejos ciclina-cinasa existentes (ver más adelante), no fluctúa durante el ciclo y de hecho se ha demostrado que fosforila también a Cdk2 en la treonina 160 y a Cdk4 en la treonina 172 (Kato y cols., 1997).



Entrada a mitosis

La activación del complejo p34cdc2-ciclina B como cinasa precede la aparición de toda una variedad de procesos celulares característicos de la entrada de las células a mitosis: fosforilación de las proteínas de la lámina nuclear, desensamblaje de la membrana nuclear, condensación cromosomal, rearreglo del citoesqueleto, formación del huso mitótico (Norbury y Nurse, 1992). Con la excepción del desensamblaje de la membrana nuclear, todos los procesos parecen ser comunes a todos los eucariontes; las levaduras y otros eucariontes inferiores no parecen requerir de la disgregación membranal. También es común que durante estos procesos se promueva la modificación por fosforilación de una gran cantidad de proteínas, las que participarán ya sea como elementos estructurales o bien como motores del profundo cambio estructural que habrá de ocurrir durante la mitosis.

La activación del complejo p34cdc2-ciclina B como cinasa precede la aparición de toda una variedad de procesos celulares característicos de la entrada de las células a mitosis.

La relación temporal existente entre la activación de MPF como cinasa y el comienzo de la reestructuración celular requerida para la entrada a mitosis, ha hecho pensar que la principal función del complejo p34cdc2-ciclina B es la fosforilación de las proteínas componentes del citoesqueleto y de la membrana nuclear. Diversas proteínas componentes del filamento intermedio como son las láminas nucleares y la vimentina, o de microfilamentos como el caldesmón, tienen sitios de fosforilación por p34cdc2 y la

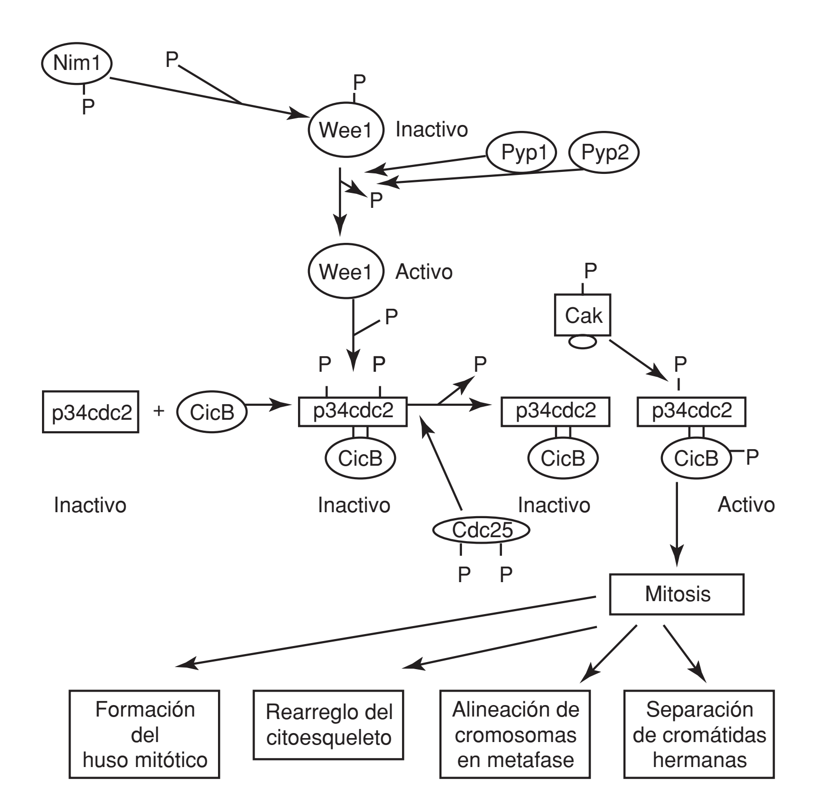


Figura 19-2. Principales procesos regulatorios durante la transición G2-mitosis.

cinasa los fosforila *in vitro* (Norbury y Nurse, 1992); además, se ha asociado la adición de MPF activa con el desensamblaje de la membrana nuclear en huevos de oocito. Visto así, parecería que MPF es la promotora del rearreglo estructural grueso que ocurre a la entrada de mitosis. Sin embargo, dado que aparentemente MPF controla sólo una fracción de las fosforilaciones que ocurren durante la mitosis, es probable que otra de sus funciones sea el iniciar una cascada de fosforilaciones, a través de la activación de otras cinasas (Luscher y cols., 1991, Norbury y Nurse, 1992), que permita el tránsito regulado a través de la mitosis. De hecho, es conocido que la fosforilación *in vitro* de elementos del citoesqueleto como el microtúbulo puede ocurrir en presencia de p34cdc2, o bien de otras cinasas relacionadas, conocidas como proteín-cinasas asociadas al microtúbulo o MAPK (Peter y cols., 1992).

Muchas otras proteínas presentan también sitios de fosforilación por p34cdc2 y son fosforiladas *in vitro*, tales como la histona H1 (la que por cierto se usa como sustrato *in vitro* para medir la actividad de p34cdc2), proteínas celulares definidas como protooncogenes o supresores tumorales, las RNA-polimerasas I y II y factores transcripcionales asociados, proteínas del nucleolo y de los centrosomas, el proteosoma de la fase M (o ciclosoma, o APC) y otras proteínas componentes del microfilamento (Norbury y Nurse, 1992; Heix y cols., 1998). No obstante, para muchas de estas proteínas no existe una comprobación directa *in vivo* de la fosforilación por p34cdc2. Adicionalmente, los eucariontes superiores poseen no una, sino una de una

amplia lista de homólogos de *cdc*2, con actividad y secuencias semejantes, que constituyen la familia de las cinasas dependientes de ciclinas, o Cdk, las que se revisarán más adelante.

La activación del proceso mitótico como resultado de la actuación de p34cdc2-ciclina B origina que las células transiten por profase, prometafase y metafase, donde los cromosomas se condensan, se anclan al huso mitótico en formación y crecimiento y finalmente se alinean en el plano de metafase. Durante estas etapas, MPF puede localizarse en diferentes estructuras nucleares como el huso mitótico, los centrosomas y los centrómeros o el cinetocoro, sugiriendo que en todas ellas habría proteínas que serían blanco de la acción de la cinasa. La súbita separación de las cromátidas hermanas al final de la metafase coincide con una rápida degradación de la ciclina B.

En situaciones en que se estabiliza la ciclina B, de tal forma que no es degradada, las células se mantienen estacionarias en metafase y no progresan hacia la culminación del ciclo (Luca y cols., 1991). Lo anterior llevó a pensar que la degradación de la ciclina B, esto es, la inactivación de MPF, era requisito para la aparición de la anafase y la culminación de la mitosis. Experimentos posteriores han demostrado que formas no degradables de la ciclina B detienen el ciclo celular en telofase, más que en anafase; aún más, la ciclina B puede estar presente después de terminada la telofase, por lo que la noción de que la destrucción de ciclinas es indispensable para la separación cromosomal no es del todo correcta (Amon y Nasmyth, 1994; Girard y cols., 1995).

Los estudios sobre el mecanismo por el cual se destruye la ciclina B han aportado datos para explicar, al menos parcialmente, la función de MPF en la transición metafase-anafase.

En el extremo amino de la ciclina B existe una secuencia de aminoácidos conocida como la caja de destrucción (aproximadamente 9 aminoácidos), la cual es reconocida por una actividad proteolítica, llamada complejo promotor de la anafase (APC) o proteosoma de M, mediada por el sistema de conjugación de la ubiquitina (Stewart y cols., 1994). La ubiquitina es un polipéptido muy conservado en eucariontes, que se encuentra ligada a diversas proteínas por un mecanismo que involucra: a) la adenilación de la ubiquitina por una enzima de activación de la ubiquitina (E1); b) la transferencia de ubiquitina a una enzima de conjugación (E2), la que reconoce sustratos específicos que recibirán a la ubiquitina, y c) la ligasa de ubiquitina (E3) que cataliza la transferencia de la ubiquitina al sustrato elegido. Las proteínas ubiquitinadas son rápidamente degradadas por el proteosoma, que representa en sí a un amplio conjunto de proteasas. La activación de la proteína E1 parece depender de la previa fosforilación por p34cdc2-ciclina B (Nagai y cols., 1995), lo que implica que se requiere que MPF active al sistema de proteasas que a su vez destruirá a MPF como cinasa. Dentro de las proteínas blanco del proteosoma se encuentran otras ciclinas y proteínas del cinetocoro, las que también poseen cajas de destrucción en su secuencia. La separación de las cromátidas hermanas durante la mitosis depende de la degradación de un grupo de proteínas que sirven como pegamento, conocidas como cohesinas; las proteasas responsables son las proteí-

> En el extremo amino de la ciclina B existe una secuencia de aminoácidos conocida como la caja de destrucción.

> La ubiquitina es un polipéptido muy conservado en eucariontes.

> Las proteínas ubiquitinadas son rápidamente degradadas por el proteosoma, que representa en sí a un amplio conjunto de proteasas.

nas separinas. La acción de las separinas es a su vez regulada por proteínas conocidas como securinas, que evitan una separación cromosomal fuera de tiempo (Stratmann y Lehner, 1996; King y cols., 1996; Zur y Brandeis, 2001).

La actividad residual de MPF en anafase y telofase funcionará en la regulación de la entrada de las células a G1.

El complejo MPF ha representado hasta ahora la unión de las proteínas p34cdc2 y ciclina B. Sin embargo, p34cdc2 se une a más de un tipo de ciclinas durante la transición G2/M. Existen diferentes tipos de ciclina B con función aparentemente no redundante; en eucariontes superiores, además de la asociación con diferentes tipos de ciclinas B, existe la asociación con la ciclina A. La cinética de aparición de ciclina A es anterior a la de ciclina B; la asociación con p34cdc2 también pareciera ocurrir antes y, especialmente, la degradación de ciclina A se adelanta a la separación cromosomal durante metafase. De hecho, se requiere p34cdc2-ciclina B activa para estimular al sistema de degradación de proteínas dependientes de ubiquitina, mas no p34cdc2-ciclina A (Stewart y cols., 1994). La función del complejo p34cdc2-ciclina A es poco clara, aunque se conoce por estudios genéticos que las diferentes ciclinas cumplen funciones importantes, no redundantes, e incluso vitales durante el ciclo. En particular, la ciclina A unida a otras Cdk en eucariontes superiores cumple una función relevante en la fase S, lo que se revisará más adelante.



Salida de mitosis y reinicio del ciclo

El reensamblaje de la membrana nuclear comienza después de iniciada la anafase para concluir hacia la telofase. Los cromosomas vuelven a rodearse de la envoltura nuclear y se produce primero la nucleocinesis y posteriormente la citocinesis, de tal forma que se generan dos células nuevas. El entorno celular cobra en estos momentos una gran importancia, ya que, a la salida de la mitosis, las células tienen que decidir si reinician la proliferación, o bien conducen su metabolismo hacia otros estados celulares. Los eucariontes unicelulares, como las levaduras, tienen como principal función la de proliferar, no así las células de los pluricelulares, como los metazoarios, las que tendrán que ubicarse en un ambiente que depende del conjunto celular donde se desarrollan. En el primer caso, las células responderán primariamente a la calidad nutritiva del medio circundante, de tal forma que, ante la presencia de los nutrientes adecuados, y no habiendo otro tipo de limitaciones externas (temperatura o pH inadecuados), el ciclo celular se iniciará nuevamente. Las células de los organismos pluricelulares tendrán que obedecer, además, las reglas impuestas por el tejido donde se ubican y requerirán de la presencia de una serie de sustancias generalmente presentes en el medio circundante conocidas como factores de crecimiento, de naturaleza hormonal. En su ausencia, la proliferación se bloqueará, entrando las células a una fase del ciclo conocida como G0, o bien podrán seguir procesos de diferenciación y especialización.

En cualquiera de los dos casos, organismos uni- o pluricelulares, la presencia de un ambiente adecuado hará que las células entren a la fase G1 del

ciclo. Esta fase se caracteriza por constituir un sensor que relaciona el estado nutricional de la célula (y, por lo tanto, la calidad del ambiente) con la decisión hacia proliferación. A nivel bioquímico, este sensor puede definirse como una serie de receptores proteicos presentes en la membrana celular, los que serán los responsables de comunicar hacia el interior de la célula que existen los factores y nutrientes necesarios para permitir la proliferación. A través de un arreglo proteico muy complejo, en el que enzimas y proteínas se ensamblan y desensamblan, las señales bioquímicas captadas en el medio externo son transmitidas hacia el interior, y en esta señalización tienen una función preponderante las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasas, en un equilibrio de adición y remoción de fosfatos que permite la activación, inactivación, movilización o asociación de diferentes enzimas y proteínas. A este proceso se le conoce como transducción de señales, cuya descripción sale del enfoque de la presente revisión. Cabe sólo mencionar para el caso que nos ocupa, que a través de la activación del metabolismo después de la salida de la mitosis, las células perciben que las condiciones están dadas para proseguir con la proliferación.

En general, durante la fase G1, las células aumentan su tamaño para asemejarlo al que tenían antes de que comenzara la mitosis; de hecho, en levaduras los cambios en la velocidad de crecimiento celular se coordinan con el proceso de división para asegurar un tamaño celular relativamente constante, y esto lo logran al alterar la duración del intervalo de G1: células creciendo lentamente tendrán una fase G1 más larga y aquellas en rápida proliferación tendrán una G1 más corta. Lo anterior llevó a la formulación de una hipótesis que establecía la existencia de un control universal de G1, una función que gobernaba el paso de las células de G1 a la de replicación del DNA o fase S (Hartwell y cols., 1974), control que fue designado como *start* (comienzo) para levaduras, o punto R (de restricción) para eucariontes superiores; el cumplir correctamente con esa función aseguraba a las células proseguir hacia S; por otra parte, su retraso o inhibición retrasaría o impediría el poder replicar el DNA.

En general, durante la fase G1, las células aumentan su tamaño para asemejarlo al que tenían antes de que comenzara la mitosis.

En *S. cerevisiae*, mutaciones que detenían el ciclo en G1 dieron las primeras claves para definir los procesos en *start*. Una mutación condicional en el gen *cdc*28 era responsable de la detención del ciclo en G1 (Hartwell y cols., 1974). La clonación y secuenciación del gen indicó que codificaba para una proteína cinasa. Poco después se describiría una cinasa de *S. pombe*, involucrada en procesos mitóticos, codificada por el gen *cdc*2, y que tenía una gran homología con *cdc*28 (Hindley y Phear, 1984). Aunque al principio esto causó gran confusión, pronto se llegó a la conclusión de que, en levaduras, la proteína cinasa p34cdc2 (p34cdc28) participaba tanto en la fase G1 como en la fase G2, evidenciando, por lo tanto, que una actividad de cinasa era fundamental para la transición hacia la fase S. Surgió entonces la duda de cómo era que se regulaban las transiciones hacia S y hacia M si en ambas participaba la misma cinasa. El aislamiento de mutantes supresoras de mutaciones termosensibles de p34cdc28 aportó nuevos datos sobre la regulación de *start*. Tres genes nuevos fueron aislados, cuyas secuencias tenían algunas características de ciclinas, y fueron llamados *cln*1, *cln*2 y *cln*3 (*cln*, ciclina); aunque ninguno de los tres resultó ser un gen esencial, la deleción

de los tres causaba detención del ciclo en un estado pre-*start* (Richardson y cols., 1989). Como era de esperarse, anticuerpos desarrollados contra cualesquiera de estas tres ciclinas de G1 coinmunoprecipitaban una actividad de cinasa, identificada posteriormente como p34cdc28. Con este tipo de ensayos fue posible hacer un seguimiento de la actividad de cinasa asociada a las ciclinas de G1 en células sincronizadas; el resultado mostró que Cln1 y Cln2 se acumulan dramáticamente en las cercanías de G1/S para luego desaparecer (Wittemberg y cols., 1990), mientras que Cln3 tenía una conducta diferente, siendo más estable. La desaparición de las ciclinas de G1 se debe a la presencia en su extremo carboxilo de una secuencia de aminoácidos, conocida como la caja PEST (por la presencia de estos aminoácidos en la región), que hacen a estas proteínas un buen blanco para los sistemas de degradación de proteínas (Wittemberg y cols., 1990). Las mutaciones en las que se ha eliminado esta secuencia han aportado más datos sobre la regulación de G1; dado que en estas mutantes las ciclinas son más estables, las células son incapaces de coordinar la ejecución de *start* con el crecimiento celular y permiten la entrada a S antes de tiempo, dando origen a un fenotipo de células pequeñas. La posición de estas ciclinas en el punto de *start* también ha ayudado a explicar el mecanismo por el cual las feromonas en levaduras inhiben el ciclo mitótico y de esta manera hacen que las células prosigan hacia meiosis. Dos productos genéticos derivados de la respuesta a feromonas, Far1 y Fus3, son inhibidores de la acción de los complejos ciclina-p34cdc28 (Chang y Herskowitz, 1990; Elion y cols., 1990).

Al parecer, una de las funciones más importantes del complejo p34cdc2(cdc28)-ciclina de G1 es la de inducir la transcripción de genes cuyos productos serán requeridos en la fase S. En *S. cerevisiae* se han descrito dos complejos transcripcionales llamados SBF y DSC1 (o MBF). SBF contiene dos proteínas llamadas Swi4 y Swi6, las que conforman un factor transcripcional que es activado por p34cdc28 en *start* (Breeden y Nasmyth, 1987); aparentemente su principal función sería promover genes cuyos productos participan en el crecimiento y elongación celulares, al activar genes involucrados en la biosíntesis de componentes de membrana y pared celular (Iyer y cols., 2001). La transcripción de los genes de *cln*1 y *cln*2 también depende de la acción de SBF; esto último indica que existe una retroalimentación positiva en la que una pequeña actividad de la cinasa p34cdc28 induce la acumulación de las Cln1 y Cln2 (a través de SBF), las que a su vez incrementarán la actividad del complejo ciclina-cinasa (Nasmyth y Dirick, 1991). El factor transcripcional DSC1 también está formado por al menos dos proteínas, una de las cuales es Swi6, y la otra se denomina Mbp1. La Swi6 tiene función de reconocimiento del DNA en ambos casos. El DSC1 promueve la transcripción de un número de genes cuyos productos están relacionados directamente con la replicación del DNA: DNA-polimerasa α, DNA-primasa, DNA-ligasa, RP-A, y otros (Merrill y cols., 1992).

El número de productos genéticos que están involucrados en la transición G1-S en levaduras está lejos de haber sido definido y mucho menos todas las interacciones que ocurren entre los productos correspondientes. Relevante, sin embargo, es el hecho de que entre los que aparecen se encuentra el sistema de degradación de proteínas mediado por ubiquitinación.

El trabajo con mutantes, especialmente con la mutante *cdc*34, determinó que la degradación de las ciclinas (Cln) es un proceso importante en el avance hacia la fase S; y no sólo esto, sino que existen inhibidores de los complejos Cln-cinasa, como el producto del gen *sic*1, que también deben ser destruidos, todos a través del sistema de proteólisis ubiquitina-dependiente (King y cols., 1996). La Cdc34 es una proteína de conjugación de la ubiquitina (enzima tipo E3).

El estudio de la fase G1 en células de eucariontes superiores resultó ser mucho más complejo. La búsqueda de secuencias de DNA con homología al gen de p34cdc2 de levaduras en otros organismos, principalmente usando la metodología de la polimerasa termoestable (PCR), evidenció la existencia de secuencias de proteínas semejantes, o variantes, de p34cdc2. Mutantes termosensibles para p34cdc2 de levadura eran rescatadas por los productos proteicos de los genes homólogos de eucariontes superiores, demostrando así una gran conservación de la función a lo largo de la evolución; no obstante, la existencia de líneas celulares de ratón con una mutación en el gen *cdc*2 en las que las células podían pasar la fase S normalmente, pero que se detenían en la transición G2/M, sugería una función diferente para p34cdc2 (Hamaguchi y cols., 1992). La clonación de un gen codificante para una variante de la cinasa p34cdc2 abrió las puertas a la aparición de una multitud de cinasas, todas ellas dependientes de ciclinas y a las que se llamó Cdk, por cinasas dependientes de ciclinas. El gen clonado fue llamado *cdk*2 (por lo tanto, p34cdc2 es también llamado Cdk1) y su función era importante para permitir el paso de las células de G1 a S, pero ineficaz en la transición G2/M (Van de Heuvel y Harlow, 1994). Las otras cinasas descritas a la fecha son Cdk3, Cdk4, Cdk5, Cdk6 y Cdk7.

La aparición de nuevas cinasas llevó a la búsqueda de nuevas ciclinas y éstas pronto aparecieron y en gran número: ciclinas C, D, E, F, G y H han sido descritas, algunas de las cuales constituyen familias; de éstas, las ciclinas D, E y H son las que más se han estudiado. El conocimiento de las interacciones entre las ciclinas y las correspondientes cinasas llevó al descubrimiento de una serie de proteínas y mecanismos que han aportado datos invaluables sobre la forma en que se regulan las diferentes fases del ciclo celular y de la integración del ciclo con el estado nutricional celular, conceptos que se revisarán más adelante.

La ciclina D parece ser la responsable de establecer la decisión de entrada al ciclo celular, actuando como sensor de factores de crecimiento y su expresión depende más de factores extracelulares que de la posición de la célula en el ciclo (Sherr, 1993). La remoción de factores de crecimiento en el medio externo provoca su rápida desaparición, lo que se relaciona con la salida de las células del ciclo. La ciclina D se asocia con al menos dos tipos diferentes de Cdk, Cdk4 y Cdk6, y existen al menos tres tipos de ciclina D, al parecer no redundantes y quizás tejido-específicas. Su actuación coincide con la transición G1/R, después de la cual existe el compromiso de las células hacia la proliferación. La pérdida de la actividad de cinasa del complejo con ciclina D antes del punto de restricción previene a los cultivos celulares de entrar a la fase S, aunque su ausencia más tarde no causa efecto alguno (Baldin y cols., 1993). Interesantemente, esta ciclina era previamente

conocida con dos nombres diferentes: Prad1 y Bcl1, correspondientes a proteínas que se sobreexpresaban en ciertos tumores, por lo que sus genes eran considerados como oncogenes (Motokura y cols., 1991). De hecho, la inyección de células que sobreexpresan ciclina D1 a ratones provoca producción de tumores (Jiang y cols., 1992).

En células en proliferación, como las que han superado el punto de restricción (R), la expresión de la ciclina E es periódica y máxima en la transición G1/S; en este intervalo, la ciclina E se encuentra asociada con su cinasa, Cdk2. La activación de este complejo ciclina E-cinasa depende de la previa actuación de ciclina D-cinasa. Lo anterior sugería que la acción del complejo con ciclina D incluía la fosforilación de sustratos que de alguna manera influían en la posterior activación del complejo con ciclina E. Tal sustrato resultó ser la proteína supresora del retinoblastoma, o pRB (Ewen y cols., 1993), una proteína originalmente descubierta en tumores de retina y cuya función es la de inhibir la actividad de un factor transcripcional necesario para la entrada de las células a la fase S, el factor E2F, heterodímero formado por las proteínas E2F y DP1 (Weintraub y cols., 1992); pRB es de esta manera un inhibidor de la progresión del ciclo celular. Lo anterior se ha demostrado plenamente al conocerse que la actividad del complejo con ciclina D no es indispensable en células que carecen de una proteína pRB funcional, en cuyo caso, las células entran a la fase S con un menor tamaño (Quelle y cols., 1993). La proteína pRB se encuentra en un estado hipofosforilado durante G1, asociada al factor E2F e inactivándolo (Weintraub y cols., 1992). El complejo con ciclina D fosforila a pRB en sitios específicos, lo que disminuye la afinidad de pRB por el factor transcripcional (Ewen y cols., 1993). Una vez que E2F se libera de pRB, se activa como factor transcripcional y promueve la expresión de genes cuyos productos intervienen en la fase S, tales como el de la subunidad catalítica de la DNA-polimerasa α replicativa, la DNA-ligasa, la proteína PCNA, la timidilato-sintasa e, interesantemente, el de la ciclina E y su mismo gen (Nevins, 1992). Cabe mencionar que existen al menos 6 tipos diferentes de E2F, cuya función puede ser la de promover o bien la de reprimir la transcripción. La ciclina E y su cinasa asociada fosforilan también a pRB, aunque en sitios diferentes a los fosforilados por la ciclina D-cinasa, muy probablemente acelerando su inactivación (Kitagawa y cols., 1996). Esta relación positiva que existe entre ciclina E y E2F produce un rápido incremento de ambas actividades según las células se acercan a los límites de G1/S. En este estado de compromiso irreversible de entrar a la fase S la inactivación, por fosforilación, de pRB cambia de ser dependiente de mitógenos (ciclina D-cinasa) a ser independiente de mitógenos (ciclina E-cinasa). Al parecer, las ciclinas A y B, con sus cinasas asociadas, también contribuyen a la fosforilación de pRB, asegurando de esta manera que esta proteína se mantenga inactiva por el resto del ciclo.

Recientemente, la proteína pRB ha recibido mucha atención al demostrarse que no es simplemente una proteína inhibidora del ciclo celular, sino que, asociada a otras proteínas, entre las que se encuentran las variantes de E2F, participa activamente en el control de la expresión genética y probablemente también en el remodelaje cromatínico (Kaelin, 1999).

La ciclina A, cuya función es necesaria en la transición hacia la mitosis, es también una proteína importante en la fase S: la síntesis de esta ciclina en G1 tardía es esencial para la entrada de las células hacia la fase S (Girard y cols., 1991), y se relaciona su presencia con la propiedad de adhesión que muestran las células en esta etapa (Zhu y cols., 1996). Además de la fosforilación de pRB por las ciclinas E y A, asociadas a Cdk2, los sustratos que fosforilan estos complejos no se conocen aún; sin embargo, se acumula evidencia que indica que éstos deben estar relacionados con la activación de los orígenes de replicación y con la localización de las proteínas que participan en la replicación del DNA.

La ciclina A, cuya función es necesaria en la transición hacia la mitosis, es también una proteína importante en la fase S.

Una vez que las células han entrado a la fase S, se requiere de la inactivación de la ciclina E y del factor E2F para la progresión del ciclo. La ciclina E es rápidamente destruida por el sistema de proteólisis ubiquitina-dependiente, después de que la ciclina es marcada para su degradación mediante fosforilación por su propia cinasa asociada, Cdk2 (Won y Reed, 1996). Por otra parte, el complejo de ciclina A-Cdk2, el cual se acumula durante la fase S, une a E2F y fosforila a una de sus subunidades proteicas, impidiendo así su unión al DNA y, por lo tanto, su actividad de transactivación (Krek y cols., 1995). Al eliminar la acción de estos dos complejos proteicos, las células estarían asegurando que el impulso bioquímico que les permite pasar de la fase G1 a la de S sólo ocurre en etapas definidas, impidiendo igualmente la acumulación innecesaria de productos génicos que de otra manera podrían ocasionar la desregulación del ciclo celular.

La inactivación de pRB no elimina del todo el requerimiento celular de factores de crecimiento presentes en el medio, indicando de esta manera que otros procesos, además de la fosforilación de pRB, contribuyen al control del punto de restricción o R. De hecho, existen al menos dos familias de proteínas cuya función primordial es la de inhibir los complejos ciclina-cinasa, para así controlar el avance del ciclo. Una de éstas la constituye el grupo de proteínas compuesto por p21cip1, p27kip1 y p57kip2, todas ellas con homología de secuencia. De éstas, p21cip1 es la más conocida, dado que su expresión depende de la previa acción del supresor tumoral p53, también llamado "el guardián del genoma".

El daño al DNA nuclear o perturbaciones en el metabolismo del DNA provoca en las células una respuesta de "emergencia", por la cual el paso hacia la fase S, o bien hacia la fase M, se detiene, dependiendo de la etapa del ciclo celular en que las células se encuentren. Esta respuesta es mediada, en gran medida, por la acción de p53, proteína que actúa inhibiendo el avance del ciclo, aunque originalmente fue descrita como una proteína presente en la mayoría de los tumores malignos (Hollstein y cols., 1991). La p53 es en realidad un modulador transcripcional, actuando ya sea para activar o para reprimir la transcripción de genes específicos; entre los genes que activa, se encuentra precisamente p21cip1; también es el paradigma de proteínas de *checkpoint*, aquellas proteínas no esenciales, cuya función es la de vigilar el avance del ciclo celular, y que participan en él sólo en casos de emergencia, como lo pueden ser el daño al DNA o la detención de su replicación. Mutaciones en p53 en las que se avanza a mitosis en condiciones de daño al DNA, serán necesariamente protooncogénicas al relajarse los controles

de avance del ciclo, permitiendo así la proliferación de células con alta potencialidad de acumulación de mutaciones. Existen varios puntos de *checkpoint* durante el desarrollo del ciclo y múltiples proteínas participan en su ejecución, cuya descripción sale del enfoque del presente trabajo.

> La acumulación de p21 es parte del mecanismo por el que p53 detiene a las células en G1.

La acumulación de p21 es parte del mecanismo por el que p53 detiene a las células en G1 (El Deiry y cols., 1993). La p21 se encuentra presente en complejos formados por diferentes ciclinas y cinasas: ciclina D-Cdk4(6), ciclina E-Cdk2 y ciclina A-Cdk2; en todos estos complejos también se encuentra presente PCNA, el factor de procesividad de la DNA-polimerasa δ replicativa. La evidencia indicaba que la función de p21 era la de impedir el paso de las células de G1 a S. Sin embargo, recientemente se ha mostrado evidencia que indicaría que, más que un inhibidor, p21 actuaría como una proteína importante en la estructuración del complejo ciclina D-Cdk4(6) y quizás también en su transporte a núcleo (Cheng y cols., 1999). Existen también datos experimentales que demuestran que p21 puede directamente inhibir la replicación del DNA al interactuar con PCNA (Waga y cols., 1994).

Por su parte, p27kip1 podría ser el factor más involucrado en el control del punto de restricción. p27kip1 se encuentra presente en altos niveles en células quiescentes, pero los niveles decaen cuando comienza la proliferación y la cantidad residual es secuestrada por el complejo de ciclina D, evitando así la inhibición por p27 de la actividad de cinasa en los complejos que contienen ciclinas E y A (Kato y cols., 1994). La remoción de factores de crecimiento de los cultivos celulares provoca la degradación de la ciclina D, y, por tanto, la liberación de p27kip1, además del incremento de su síntesis, lo que ocasiona que las células se estacionen en G1 o bien salgan hacia G0.

La otra familia de inhibidores de ciclinas-cinasas está compuesta por una serie de proteínas de bajo peso molecular, p16Ink4a, p15Ink4b, p18Ink4c y p19Ink4d (p19 ARF) que también actúan como supresores de tumores. La función de estos inhibidores de proliferación está más localizada hacia la fase G1 temprana, donde las proteínas cinasas Cdk4 y Cdk6 son su blanco más importante, impidiendo de esta manera el establecimiento del compromiso de proliferación. Al parecer, su acumulación es dependiente del estado nutricional celular. La expresión de las diferentes proteínas Ink4 parece ser tejido-específico por lo que no son redundantes (Sherr, 1996).



La fase S

> Una vez que se ha cumplido con todos los requisitos que la fase G1 establece para que el ciclo pueda avanzar, y que se han acumulado o activado las enzimas y proteínas necesarias para que se lleve a cabo la replicación del DNA, la fase S puede comenzar.

Una vez que se ha cumplido con todos los requisitos que la fase G1 establece para que el ciclo pueda avanzar, y que se han acumulado o activado las enzimas y proteínas necesarias para que se lleve a cabo la replicación del DNA, la fase S puede comenzar. Los cromosomas en una célula eucarióntica se duplican una vez y sólo una por ciclo celular; deben, por lo tanto, existir controles que eviten que se dé la reduplicación dentro de un mismo ciclo. La evidencia aportada originalmente por Johnson y Rao (1970) en experimentos de fusión celular, acerca de la existencia de un factor que inducía la entrada a la fase S de núcleos de células en G1, pero no de aquéllas en G2, y que estaba presente en núcleos de células en S, pero ausente en células en

fase G2, sugerían ya la presencia de factores regulatorios exclusivos de la fase S. Además, estos experimentos indicaban que sólo los cromosomas de células en G1 podían comenzar la replicación, mientras que los de G2 tenían que pasar por mitosis antes de volver a ser competentes para replicar el DNA.

Para explicar los resultados anteriores surgió la hipótesis de la existencia de un "factor de licenciamiento" de la replicación del DNA, el cual se encontraba presente en núcleos al momento de la replicación del DNA y que era excluido del núcleo, o bien degradado (o inactivado), y que sólo podía volver a entrar al núcleo, luego de su resíntesis, al momento de la ruptura de la membrana nuclear durante la profase de mitosis (Blow y Laskey, 1988). El factor permitiría una sola ronda de replicación antes de volver a ser inactivado.

La descripción de una serie de proteínas que se unen a orígenes de replicación en cromosomas de levaduras, y que se encuentran también presentes en regiones discretas del DNA de eucariontes superiores, ha permitido confirmar la existencia de tal factor de licenciamiento. Los orígenes de replicación en levaduras (ARS) son reconocidos por un conjunto de proteínas conocido como ORC, por complejo de reconocimiento del origen (Bell y Stillman, 1992). Este conjunto de 6 proteínas diferentes, todas esenciales, se encuentra unido persistentemente en los orígenes de replicación cromosomal; sin embargo, la secuencia de DNA que protege este complejo proteico cambia según avanza el ciclo, sugiriendo la existencia de dos estados del cromosoma en los orígenes. La segunda estructura cromosomal se debe a la asociación de un nuevo conjunto de proteínas, constituido por el heterohexámero de las proteínas MCM o de "mantenimiento de minicromosomas" y por las proteínas Cdc6 y Cdt1, las que se unen a la cromatina en mitosis tardía y permanecen unidas hasta que son gradualmente removidas según avanza S (Stillman, 1996). Todas estas proteína son esenciales. La regulación de la asociación de las diferentes proteínas está dada por procesos de fosforilación-desfosforilación, en los que participan activamente dos cinasas heterodiméricas: una ciclina-Cdk y otra cinasa formada por las proteínas Cdc7-DBF4 (Sclafani, 2000), para promover las estructuras cromosomales prerreplicación y posreplicación. En eucariontes superiores, ciclina E-Cdk2 y ciclina A-Cdk2 regularían el inicio y el avance de la fase S, mientras que ciclina A-Cdc2 vigilaría la irreversibilidad después de entrar a G2. En levaduras, la función de ciclina E-Cdk2 la realizan dos ciclinas con características estructurales de ciclina mitótica, pero que funcionan en la fase S como son las Clb5 y Clb6, asociadas a p34cdc2 (Stillman, 1996).

Evidentemente, los diferentes complejos de ciclinas con cinasas constituyen los puntos de control a lo largo del ciclo celular. Sobre ellos recae la responsabilidad primaria de activar las diferentes etapas del ciclo y son los receptores de otras proteínas que ejercerán sobre ellos procesos de modificación, secuestro, destrucción o activación, que permitirán el avance del ciclo, o su alargamiento o detención si las condiciones no son propicias para que se establezca la proliferación. No es sorprendente entonces que algunas ciclinas, y algunas de las proteínas con las que interactúan, hayan sido originalmente identificadas como factores oncogénicos: la regulación del ciclo

Los diferentes complejos de ciclinas con cinasas constituyen los puntos de control a lo largo del ciclo celular.

celular se desquiciaría en células en que las proteínas de control no funcionaran apropiadamente (por ejemplo, por mutación), permitiendo o aun promoviendo la proliferación en condiciones ambientales inadecuadas o restrictivas, o en condiciones de excesivo daño al DNA, lo que incrementaría la probabilidad de fijar nuevas mutaciones.

El ciclo celular en plantas

El ciclo celular en las células vegetales ha sido estudiado principalmente a niveles fisiológico y citológico y presenta coincidencias con el de los otros tipos de eucariontes. Sin embargo, a diferencia de como ha ocurrido en células de levaduras, protozoarios, insectos, anfibios, mamíferos, etc., ha sido escasamente estudiado a niveles bioquímico y molecular. Sólo en los últimos años la investigación sobre este tópico ha cobrado auge y los resultados comienzan a acumularse. El enfoque inicial fue el de encontrar las proteínas homólogas a Cdk y ciclinas y se ha ampliado notablemente, de tal forma que a últimas fechas la información acumulada es considerable.

El desarrollo de las plantas, comparado con el de los animales, es modificado significativamente por el ambiente en el que se encuentran y, por lo tanto, influye en la proliferación celular y el crecimiento. La actividad de proliferación radica particularmente en los meristemos, centros de proliferación celular presentes en la mayoría de los tejidos en crecimiento. La acción de agentes externos, así como la de hormonas vegetales, modificarán principalmente la fase G1 del ciclo, acortándola o alargándola. Por lo anterior, la fase G1 ha sido el foco de atención de los estudios a nivel molecular del ciclo celular.

Se han clonado y secuenciado al menos tres tipos diferentes de ciclinas tipo D, las que muestran diferencias importantes con las descritas para mamíferos y, en general, tampoco parecen tener una regulación dependiente de mitógenos, con excepción de la ciclina D3. Esta ciclinas tipo D se asocian a cinasas tipo Cdc2 y no existe evidencia que sugiera la existencia de cinasas tipo Cdk4 o Cdk2. De hecho, las variantes de cinasas existentes en plantas están relacionadas a Cdc2 y se les distingue como Cdc2a, Cdc2b1 o Cdc2b2 y, contrario a lo descrito para células de mamíferos, su expresión es regulable durante el ciclo (Den Boer y Murray, 2000).

Los sustratos para las ciclinas-cinasas de G1 se desconocen, aunque la identificación de proteínas tipo pRB en plantas muestra que existe conservación en los mecanismos básicos de control del ciclo en eucariontes (Gutiérrez, 1998). Más aún, recientemente se clonó el gen codificante para el factor transcripcional E2F, reforzando así el concepto de mecanismos conservados (Den Boer y Murray, 2000). *In vitro*, los complejos de ciclina D-cinasa fosforilan eficientemente a la proteína pRB; no obstante, aún falta una demostración fisiológica de esta interacción y su significado funcional.

El gen codificante para la proteína PCNA también ha sido clonado y se ha observado que esta proteína forma complejos con ciclinas cinasas de G1 (López y cols., 1995; Cruz-García y cols., 1998). La cinasa en estos complejos es similar a una Cdc2 y es capaz de fosforilar tanto a la proteína histona H1

como a pRB. Proteínas homólogas a la cinasa de Cdk o Cak, del inhibidor de Cdc2, Wee1 y de la proteína inhibidora de G1, p21Cip1 han sido recientemente descritas (Den Boer y Murray, 2000). Interesantemente, la expresión de esta última es estimulada en respuesta a hormonas vegetales que inhiben el ciclo celular. Ciclinas tipo A y B, asociadas a Cdc2 se han relacionado con la fase G2/M del ciclo, aunque su regulación no pareciera ser tan estricta.

Un ejemplo de modelo fisiológico vegetal en el que el ciclo celular es muy relevante es la germinación de semillas. Las células en las semillas, al ser embebidas, reanudan sus procesos bioquímicos, los que gradualmente van cobrando mayor dinamismo en pro de la formación de una plántula. Los mecanismos que permiten la proliferación celular tendrán que activarse en algún momento después de la imbibición y ejercerán una función esencial en el establecimiento de la plántula.

El estudio de proteínas del ciclo celular durante la germinación de maíz ha indicado que en los embriones de la semilla seca están presentes, y en su caso en forma activa, todas aquellas que han sido buscadas: proteínas de G1 como ciclina D, Cdc2a, pRB y E2F. Proteínas de las fases S y G2 también están presentes en el embrión: PCNA, DNA-polimerasas replicativas, DNA-primasa, ciclina B y probablemente Cdc2b. Interesantemente, cada una de estas proteínas presenta un comportamiento diferente durante la germinación de las semillas. Una actividad cuya función es primordial para que se inicie la fase G1, la cinasa compuesta por ciclina D-Cdc2a es activada inicialmente y luego la ciclina es degradada entre las fases G1 y S, perdiéndose la actividad de cinasa; otras proteínas son simplemente degradadas durante G1, como pRB, probablemente porque su función ha terminado. Proteínas cuya función es importante en la fase S se acumulan o bien se incrementa su actividad: PCNA, DNA-polimerasas replicativas, DNA-primasa. Los niveles de las proteínas de la fase G2/M no parecen cambiar; sin embargo, es notable su activación y su movilización hacia núcleo, su sitio de acción, según la germinación progresa (Cruz-García y cols., 1998; Coello y Vázquez-Ramos, 1995; García y cols., 1997; Herrera-Teigeiro y cols., 1999; Herrera y cols., 2000). Por lo tanto, pareciera ser que durante un proceso de desarrollo como es la germinación, el control de los actores que participan en el ciclo celular se da a varios niveles: inicialmente, debe haber activación enzimática vía un sistema de transducción de señales que modifique algunas de las proteínas presentes desde el estado seco en el embrión, de manera principal, aunque no exclusivamente, aquellas necesarias en G1. En esta etapa, la proteólisis pareciera también tener una función esencial. Tanto modificación enzimática como expresión *de novo* serán necesarias para otras proteínas, como aquellas de la fase S. Finalmente, la modificación proteica y la relocalización celular se requerirán para la activación de proteínas de G2.

El estudio del ciclo celular en plantas está en sus etapas iniciales y falta mucho por conocerse. Debe considerarse, no obstante, que las células vegetales tienen otro tipo de presiones que las diferencian de las células de animales: tienen una vida sésil, por lo que han desarrollado mecanismos de respuesta efectivos para adaptarse a cambios ambientales como luz, gra-

vedad, heridas, nutrientes y condiciones de estrés, y muchas veces en estas respuestas se modifican los patrones de división celular. Además, las células vegetales poseen una pared rígida, que impide a las células moverse y, por lo tanto, la organogénesis depende de la división celular y la expansión de células en el sitio de formación de nuevos órganos. Resulta alentador pensar que el control del ciclo celular en plantas utilizará quizás los mismos actores, pero muy probablemente mecanismos regulatorios diferentes.



Referencias bibliográficas

Amon, A. y Nasmyth, K., *Cell,* **77:** 1037, 1994.
Baldin, V.; Lukas, J.; Marcote, M.J.; Pagano, M. y Draetta, G., *Genes Dev.,* **7:** 812, 1993.
Beach, D.; Durcakz, B. y Nurse, P., *Nature,* **300:** 706, 1982.
Bell, S.P. y Stillman, B., *Nature,* **357:** 128, 1992.
Blow, J.J. y Laskey, R.A., *Nature,* **332:** 546, 1988.
Booher, R.; Alfa, C.E.; Hyams, J.S. y Beach, D.H., *Cell,* **58:** 485, 1989.
———— ; Hayles, J. y Nurse, P., *J. Cell Sci.,* **91:** 587, 1988.
Breeden, L. y Nasmyth, K., *Cell,* **48:** 389, 1987.
Chang, F. y Herskowitz, I., *Cell,* **63:** 999, 1990.
Cheng, M.; Olivier, P.; Diehl, J.A.; Fero, M.; Roussel, M.F.; Roberts, J.M. y Sherr, C.J., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **18:** 1571, 1999.
Coello, P. y Vázquez-Ramos, J.M., *Eur. J. Biochem.,* **231:** 99, 1995.
Cruz-García, F.; Zúñiga, J.J. y Vázquez-Ramos, J.M., *Physiol. Plant,* **102:** 573, 1998.
Den Boer, B.G.W. y Murray, J.A.H., *TICB,* **10:** 245, 2000.
El Deiry, W.S.; Tokino, T.; Velculesco, V.E.; Levy, D.B.; Parsons, R.; Trent, J.M.; Lin, D.; Mercer, W.E.; Kinzler, K.W. y Vogelstein, B., *Cell,* **75:** 817, 1993.
Elion, E.A.; Grisafi, P. y Fink, G.R., *Cell,* **60:** 649, 1990.
Evans, T.; Hunt, T. y Youngblom, J., *Biol. Bull.,* **163:** 372, 1982.
Ewen, M.E.; Sluss, H.K.; Sherr, C.J.; Matsushime, H.; Kato, J. y Livingston, D.M., *Cell,* **73:** 487, 1993.
García, E.; Orjuela, D.; Camacho, Y.; Zúñiga, J.J.; Plasencia, J. y Vázquez-Ramos, J.M., *Plant Mol. Biol.,* **33:** 445, 1997.
Girard, F.; Fernandez, A. y Lamb, N., *J. Cell. Sci.,* **108:** 2599, 1995.
———— ; Strausfeld, U.; Fernández, A. y Lamb, N.J.C., *Cell,* **67:** 1169, 1991.
Gutiérrez, C., *Curr. Opin. Plant Biol.,* **1:** 492, 1998.
Hagting, A.; Karlsson, C.; Clute, P.; Jackman, M. y Pines, J., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **17:** 4127, 1998.
Hamaguchi, J.R.; Tobey, R.A.; Pines, J.; Crissman, H.A.; Hunter, T. y Bradbury, E.M., *J. Cell Biol.,* **117:** 1041, 1992.
Hartwell, L.H.; Culotti, J.; Pringle, J. y Reid, B.J., *Science,* **183:** 46, 1974.
Heix, J.; Vente, A.; Voit, R.; Budde, A.; Michaelidis, T.M. y Grummt, I., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **17:** 7373, 1998.
Herrera, I.; Sánchez, M.P.; Molina, J.; Plasencia, J. y Vázquez-Ramos, J.M., *Physiol. Plant,* **110:** 127, 2000.
Herrera-Teigeiro, I.; Jiménez, L.F. y Vázquez-Ramos, J.M., *Seed Sci. Res.,* **9:** 55, 1999.
Hindley, J. y Phear, G.A., *Gene,* **31:** 129, 1984.
Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B. y Harris, C.C., *Science,* **253:** 49, 1991.

Iyer, V.R.; Horak, C.E.; Scafe, C.S., Botstein, D.; Snyder, M. y Brown, P.O., *Nature,* **409:** 533, 2001.
Jiang, W.; Kahn, S.M.; Tomita, N.; Zhang, Y.J.; Lu, S.H. y Weinstein, I.B., *Cancer Res.* **52:** 2980, 1992.
Johnson, R.J. y Rao, P.N., *Nature,* **226:** 717, 1970.
Kaelin, W.G., *BioEssays,* **21:** 950, 1999.
Kato, A.; Takahashi, H.; Takahashi, Y. y Matsushime, H., *J. Biol. Chem.,* **272:** 8065, 1997.
Kato, J.; Matsuoka, M.; Polyak, K.; Massagué, J. y Sherr, C.J., *Cell,* **79:** 487, 1994.
King, R.W.; Deshaies, R.J.; Peters, J.M. y Kirschner, M.W., *Science,* **274:** 1652, 1996.
Kitagawa, M.; Higashi, H.; Jung, H.K.; Suzuki-Takahashi, I.; Ikeda, M.; Tamai, K.; Kato, J.; Segawa, K.; Yoshida, E.; Nishimura, S. y Taya, Y., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **15:** 7060, 1996.
Krek, W.; Xu, G. y Livingston, D.M., *Cell,* **83:** 1149, 1995.
Li, J.; Meyer, A.N. y Donoghue, D.J., *PNAS,* EE.UU., **94:** 502, 1997.
Lohka, M.J.; Hayes, M.K. y Maller, J.L., *PNAS,* EE.UU., **85:** 3009, 1988.
López, I.; Khan, S.; Vázquez-Ramos, J. y Hussey, P., *B.B. Acta,* **1260:** 119, 1995.
Luca, F.C.; Shibuya, E.K.; Dorhmann, C.E. y Ruderman, J.V., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **10:** 4311, 1991.
Lundgren, K.; Walworth, N.; Booher, R.; Dembski, M.; Kirschner, M. y Beach, D., *Cell,* **64:** 115, 1991.
Luscher, B.; Brizuela, L.; Beach, D. y Eisenmann, R.N., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **10:** 865, 1991.
Masui, Y. y Markert, C.L., *J. Exp. Zool.,* **177:** 129, 1971.
Merril, G.F.; Morgan, B.A.; Lowndes, N.F. y Johnston, L.H., *Bioassays,* **14:** 823, 1992.
Millar, J.B.A.; McGowan, C.H.; Laeners, G.; Jones, R. y Russell, P., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **10:** 4301, 1991.
Moreno, S.; Hayles, J. y Nurse, P., *Cell,* **58:** 361, 1989.
———— ; Nurse, P. y Russell, P., *Nature,* **344:** 549, 1990.
Motokura, T.; Bloom, T.; Kim, H.G.; Jüppner, H.; Ruderman, J.V.; Kronenberg, H.M. y Arnold, A., *Nature,* **350:** 512, 1991.
Nagai, Y.; Kaneda, S.; Nomura, K.; Yasuda, H.; Seno, T. y Yamao, F., *J. Cell Sci.,* **108:** 2145, 1995.
Nasmyth, K. y Dirick, L., *Cell,* **66:** 995, 1991.
Nevins, J.R., *Science,* **258:** 424, 1992.
Norbury, C. y Nurse, P., *Annu. Rev. Biochem.,* **61:** 441, 1992.
Nurse, P. y Bisset, Y., *Nature,* **292:** 558, 1981.
Ottilie, S.; Chernoff, J.; Hannig, G.; Hoffman, C.S. y Erickson, R.L., *Mol. Cell. Biol.,* **12:** 5571, 1992.
Parker, L.L.; Atherton-Fessler, S. y Piwnica-Worms, H., *PNAS,* EE.UU., **89:** 2917, 1992.
Peter, M.; Sanghera, J.S.; Pelech, S.L. y Nigg, E.A., *Eur. J. Biochem.,* **205:** 287, 1992.
Pines, J. y Hunter, T., *J. Cell Biol.,* **115:** 1, 1991.
Quelle, D.E.; Ashmun, R.A.; Shurtleff, S.A.; Kato, J.Y.; Bar-Sagi, D.; Roussel, M.F. y Sherr, C.J., *Genes Dev.,* **7:** 1559, 1993.
Rao, P.N. y Johnson, R.J., *Nature,* **225:** 159, 1970.
Richardson, H.E.; Wittemberg, C.; Cross, F.R. y Reid, B.J., *Cell,* **59:** 1127, 1989.
Russel, P. y Nurse, P., *Cell,* **49:** 559, 1987.
Sclafani, R.A., *J. Cell Sci.,* **113:** 2111, 2000.
Sherr, C.J., *Cell,* **73:** 1069, 1993.
————, *Science,* **274:** 1672, 1996.

Simanis, V. y Nurse, P., *Cell,* **45:** 261, 1986.

Stewart, E.; Kobayashi, H.; Harrison, D. y Hunt, T., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **13:** 584, 1994.

Stillman, B., *Science,* **274:** 1659, 1996.

Stratmann, R. y Lehner, C.F., *Cell,* **84:** 25, 1996.

Van de Heuvel, S. y Harlow, E., *Science,* **262:** 2050, 1994.

Waga, S.; Hannon, G.J.; Beach, D. y Stillman, B., *Nature,* **369:** 574, 1994.

Weintraub, S.J.; Prater, C.A. y Dean, D.C., *Nature,* **358:** 259, 1992.

Wittemberg, C.; Sugimoto, K. y Reed, S.I., *Cell,* **62:** 225, 1990.

Won, K.A. y Reed, S., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **15:** 4182, 1996.

Wu, L. y Russell, P., *Nature,* **363:** 738, 1993.

Zhu, X.; Ohtsubo, M.; Böhmer, R.M.; Roberts, J.M. y Assoian, K., *J. Cell Biol.,* **133:** 391, 1996.

Zur, A. y Brandeis, M., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **20:** 792, 2001.

Capítulo 20

MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Susana Castro Obregón ■ Luis Fernando Covarrubias Robles



Generalidades

Las células mueren de manera programada durante el desarrollo: la MCP

Durante el desarrollo de los organismos, se eliminan ciertas células, ya sea por haberse producido en exceso, o porque forman parte de estructuras transitorias durante la formación del organismo adulto. Dicha eliminación ocurre por un proceso que involucra muerte celular, donde la eliminación de los restos celulares se realiza por fagocitosis. Este tipo de muerte celular participa en diversos procesos, tales como: la eliminación de 50% de las neuronas que se producen durante el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados; la degeneración de estructuras remanentes de la evolución (por ejemplo, cola en los amniotas) o que no son necesarias en uno de los sexos (por ejemplo, conducto mülleriano en machos y de Wolf en hembras); en la formación de estructuras como los dígitos del miembro; durante la metamorfosis de invertebrados, donde todas las células larvarias mueren para que los discos imagales proliferen y se diferencien, organizando al organismo reproductor, etc.

La reproducibilidad en tiempo y en espacio con la que se lleva a cabo el proceso de muerte celular durante el desarrollo, ha dado lugar a la denominación de “muerte celular programada” (MCP) (Driscoll y Chalfie, 1992). Esta muerte natural de las células está diseñada de tal forma que el contenido intracelular no se vierta al exterior, como ocurre en la muerte accidental de algunas células ante condiciones nocivas extremas (por ejemplo, necrosis), causando daño al tejido adyacente y, en el organismo adulto, inflamación (Shwartzman, y Cidlowski, 1993).

La reproducibilidad en tiempo y en espacio con la que se lleva a cabo el proceso de muerte celular durante el desarrollo, ha dado lugar a la denominación de “muerte celular programada”.

La MCP también ocurre en el organismo adulto para controlar la masa celular de algunos órganos como el hígado, en el recambio continuo de algunos epitelios y en el funcionamiento del sistema inmune. La reproducibilidad y precisión del proceso de muerte en este caso están ex-

clusivamente determinados por factores ambientales, por lo que una denominación más acorde es la de "muerte fisiológica". Sin embargo, la similitud entre el proceso de muerte en el embrión y el que ocurre en el adulto ha llevado a usar los términos de MCP y muerte fisiológica de manera indistinta.

El control de la muerte celular es fundamental, no sólo por las repercusiones drásticas si no se realiza adecuadamente durante el desarrollo, sino también porque la falta o exceso de muerte celular puede conducir a trastornos en el organismo adulto. Así, por ejemplo, alteraciones que induzcan muerte celular fuera de tiempo o de lugar producen enfermedades degenerativas, como la enfermedad de Alzheimer o el mal de Parkinson, ambas asociadas a muerte neuronal, mientras que una inhibición de la apoptosis puede ser crítica en el surgimiento del cáncer (White, 1993).

Factores externos afectan la sobrevivencia celular

Dos mecanismos podrían desencadenar el proceso de MCP. En uno de ellos una señal extracelular activaría el proceso de muerte (es decir, señal de muerte), mientras que, en otro, las señales extracelulares podrían estar impidiendo la muerte de la célula (es decir, factores de sobrevivencia). Aunque, como veremos más adelante, ambos mecanismos existen en organismos superiores, se ha propuesto que la mayoría de las células están "listas" para morir y que requieren, por tanto, de la presencia continua de factores extracelulares para promover su sobreviviencia (Raff y cols., 1993).

Varios datos apoyan esta hipótesis, como la necesidad de factores extracelulares provenientes, por ejemplo, del suero que se utiliza para mantener en cultivo la mayoría de las células animales. Por otro lado, durante el desarrollo del sistema nervioso, ocurre una muerte neuronal masiva, donde sobreviven sólo aquellas neuronas cuyos axones alcanzaron su célula blanco, proveedora de las señales necesarias para mantener vivas a las neuronas (como el factor de crecimiento nervioso, NGF) (Raff y cols., 1993). Igualmente, el tamaño de un órgano podría depender de factores de sobrevivencia limitantes, es decir, que sólo un número limitado de células tenga acceso a ellos: si el número de células aumenta este valor, el exceso de células automáticamente muere. De hecho, se ha observado que, si se induce artificialmente la proliferación de hepatocitos, el hígado aumenta su tamaño, mientras que basta retirar la droga para que éste regrese a su tamaño anterior. Puesto que existen factores de sobrevivencia para tipos celulares específicos, la muerte también podría ser un mecanismo para corregir errores durante el desarrollo, al eliminar de esta manera a las células que migraron hacia una región equivocada, pues no recibirían los factores de sobrevivencia que necesitan.

En consecuencia, se puede considerar que, al menos en organismos superiores, las células necesitan de señales de otras células para sobrevivir, de la misma manera que una célula necesita señales de otras células para proliferar o diferenciarse.

> Las células necesitan de señales de otras células para sobrevivir, de la misma manera que una célula necesita señales de otras células para proliferar o diferenciarse.

Diferentes tipos celulares mueren mediante un mecanismo principal: la apoptosis

Aunque no están aún totalmente esclarecidos los mecanismos que controlan la MCP, estudios detallados de la morfología de las células que mueren en el desarrollo han identificado tres formas distintas: la forma tipo 1, denominada apoptosis; la forma tipo 2, o autofagia, y la forma tipo 3, llamada muerte vesicular no lisosomal (Clarke, 1990). La forma de muerte más abundante es al parecer la apoptosis (*apoptosis*, en griego arcaico, alude a la "caída natural de las hojas en otoño") y es de la que se conoce mucho más, por lo que el presente capítulo se dedicará exclusivamente a ella.

La forma de muerte celular programada más abundante es al parecer la apoptosis.

Los primeros cambios morfológicos que ocurren durante la apoptosis incluyen la pérdida de los contactos celulares y estructuras membranales especializadas (por ejemplo, microvellosidades), así como la formación de protuberancias. Asociada a estos cambios, se da una disminución de la turgencia, aparentemente debido a la pérdida de líquido intracelular e iones. También hay una translocación de fosfatidilserina de la capa interna de la membrana plasmática hacia la capa externa, como consecuencia de un incremento de la actividad de flipasa. Por otro lado, la cromatina se condensa, se fosforila y desensambla la lámina nuclear; posteriormente se fragmenta el núcleo, mientras que el retículo endoplásmico se dilata y forma vesículas que se fusionan con la membrana plasmática. Finalmente, la célula se rompe en varias vesículas (llamadas cuerpos apoptóticos) que contienen organelos intactos y fragmentos nucleares, los cuales son fagocitados. A nivel bioquímico, ocurre la activación de proteasas específicas denominadas caspasas (que se detallarán más adelante), a consecuencia de lo cual se activa una endonucleasa que degrada paulatinamente el DNA, generando inicialmente fragmentos de más de 50 kb y luego multímeros de nucleosomas (Shwartzman y Cidlowski, 1993). Además, se detecta actividad de transglutaminasa (Fesus y cols., 1989) y una degradación específica de la enzima poli (ADP-ribosa)-polimerasa (PARP), que normalmente participa en la reparación del DNA (Kaufmann, 1993).

Es importante notar, sin embargo, que no todos los tipos celulares presentan todas las características anteriores. Por ejemplo, hay casos en los que no hay degradación internucleosomal del DNA, pero invariablemente los organelos se mantienen intactos dentro de los cuerpos apoptóticos que son fagocitados por las células vecinas, ya que es condición esencial para que no se cause daño al tejido. Por tanto, frecuentemente las características bioquímicas se utilizan como un indicio de que posiblemente se activó un proceso de muerte celular apoptótica.

La MCP es autónoma y las células destinadas a morir son potencialmente funcionales

A finales de la década de 1980, la MCP se había estudiado fundamentalmente *in vivo* y, puesto que en este contexto es difícil disociar la muerte celular

del proceso de fagocitosis, llegó a considerarse que las células fagocíticas eran las desencadenantes de la muerte, es decir, estas células "asesinaban" a sus vecinas. Esta impresión ha resultado equivocada en lo general, ya que, cuando se evita la fagocitosis, aún ocurre la muerte celular. Así, entonces, la actividad fagocítica resulta ser un proceso tardío, encargado sólo de eliminar los cuerpos apoptóticos resultantes de la muerte celular. Lo anterior también implica que la célula que va morir cuenta con todos los elementos para su propia destrucción, razón por la que suele decirse que la MCP ocurre por "suicidio". No obstante, es importante señalar que la MCP siempre se desencadena por la ausencia o presencia de una señal externa (Hedgecock y cols., 1983).

¿Es la MCP un mecanismo para eliminar células con carencias funcionales? Ésta es una pregunta fundamental a la que hay que responder, especialmente en la muerte que ocurre durante el desarrollo, pues podría ser que la muerte celular ocurriera como parte de un proceso de "selección natural" dentro del organismo. Los primeros indicios que ayudaron a responder a esa pregunta provinieron de estudios en el nematodo *Caenorhabditis elegans,* en el que, gracias a que se conoce la genealogía de cada célula, fue posible determinar si una célula destinada a morir es capaz de sustituir a su hermana funcional. Por ejemplo, si con un rayo láser se destruye específicamente la neurona encargada del funcionamiento de la faringe en nematodos jóvenes (M4), en una mutante en la cual la mayoría de las células destinadas a morir sobreviven, ésta se puede sustituir por su célula hermana, originalmente destinada a morir (Avery y Horvitz, 1987). Por lo tanto, las células que se mueren de manera programada durante el desarrollo son capaces de diferenciarse y, consecuentemente, son potencialmente funcionales.

Las células que se mueren de manera programada durante el desarrollo son capaces de diferenciarse y, consecuentemente, son potencialmente funcionales.

Se requieren genes específicos para desencadenar la muerte celular

La MCP es un proceso tan fundamental durante el desarrollo embrionario como la proliferación y la diferenciación celular.

Ahora se acepta ampliamente que la MCP es un proceso tan fundamental durante el desarrollo embrionario como la proliferación y la diferenciación celular, y se considera equivalente a un programa génico de diferenciación, que forma parte de un repertorio de posibles respuestas celulares a un estímulo externo. En algunos casos, es necesaria la síntesis de proteínas para desencadenar el proceso de MCP, como en las neuronas que requieren de NGF para sobrevivir, pues bloqueadores de la transcripción o la traducción tienen un efecto protector cuando son cultivadas en ausencia de NGF (Martin y cols., 1988). La activación génica es necesaria también durante la metamorfosis de *Manduca sexta*, en la que genes específicos se inducen por ecdisona durante la muerte de los músculos intersegmentales (Schwartz y cols., 1990). Entonces, en similitud con la activación de varios procesos del desarrollo, se considera que la activación de la muerte celular puede involucrar la transcripción de genes específicos.

C. elegans ha sido un sistema que ha permitido la identificación de algunos de los genes necesarios, ya sea para promover o para impedir la

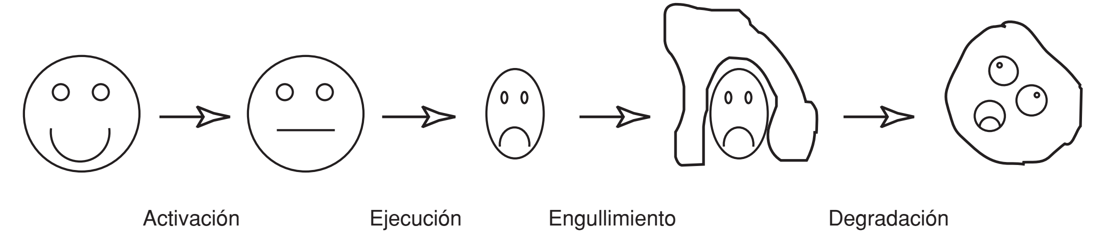


Figura 20-1. Las fases del proceso de MCP.

muerte celular. De acuerdo al proceso que es bloqueado por mutaciones específicas en este organismo, se han definido cuatro fases dentro del proceso de muerte: la determinación de morir, la ejecución de la muerte, el ser engullidas por las células vecinas y finalmente la degradación de los cuerpos apoptóticos dentro de las células fagocíticas (figura 20-1).

Aunque se han identificado varios genes en *C. elegans* para las fases de ejecución, engullimiento y degradación, la naturaleza de las proteínas codificadas por los genes involucrados en las últimas dos fases se desconoce. Por otro lado, mientras que los genes encargados de la ejecución, engullimiento y degradación de las células afectan a casi todos los tipos celulares, los genes de determinación afectan a poblaciones particulares de células (Steller, 1995). Un ejemplo de ello es el gen denominado *ces-2*, que codifica para un factor de transcripción que participa en la muerte de las neuronas motoras serotoninérgicas (NSM), ya que mutantes que pierden la función de este gen tienen dos NSM extra en la faringe (Metzstein y cols., 1996).

La ejecución del programa de muerte ha sido la más estudiada y se han identificado tres genes esenciales: *ced-3* y *ced-4*, en cuya ausencia la muerte se evita, y *ced-9* que protege de la muerte provocada por el producto de *ced-3* y *ced-4*. El gen *ced-8*, que fue originalmente propuesto como un gen asociado al proceso de fagocitosis, pudiera ser otro componente de la fase de ejecución, ya que mutantes en este gen tienen el mismo fenotipo que mutantes débiles en *ced-3* y rescatan el fenotipo de mutantes débiles en *ced-9*.



Las cisteín-proteasas (caspasas) en la muerte celular

Las caspasas son fundamentales para la ejecución de la muerte

El producto del gen *ced-3* (CED-3) (Miura y cols., 1993; Hugunin y cols., 1996) presenta similitudes funcionales y estructurales con la enzima interconvertidora de interleucina-1β (ICE), denominada caspasa-1, una cisteín-proteasa de mamífero que genera la forma madura de interleucina-1β (IL-1β) (Yuan y cols., 1993). De acuerdo al papel previsto de las mutantes en c*ed-3* y la similitud de su producto con caspasa-1, tanto la sobreproduc-

ción de CED-3 como la de caspasa-1 de humano pueden causar apoptosis en fibroblastos de ratón (Metzstein y cols., 1996). La relevancia en vertebrados de este resultado se resalta por el hecho de que inhibidores específicos de caspasa-1 son capaces de evitar la muerte de células destinadas a morir o de aquellas que han sido sujetas a condiciones en que su sobrevivencia es limitada; por ejemplo, la muerte de neuronas de pollo desprovistas de NGF puede evitarse cuando el gen *crmA* (*cytokine response modifier A*) del virus de la viruela de la vaca, un inhibidor específico de caspasas, se expresa en ellas (Gagliardini y cols., 1994). Es decir, que tanto en organismos invertebrados como en vertebrados, proteasas con similitud a CED-3 son fundamentales para que la apoptosis ocurra. Actualmente se han identificado 14 caspasas en mamíferos y cuatro en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Todas ellas presentan una secuencia conservada de cinco aminoácidos (QACR[N/Q]G) en el sitio activo.

Las caspasas existen en las células normales como cimógenos inactivos, análogos a los cimógenos que regulan la coagulación sanguínea.

Las caspasas existen en las células normales como cimógenos inactivos, análogos a los cimógenos que regulan la coagulación sanguínea. Cuando las células inician la apoptosis, las caspasas se activan a través de uno o dos cortes proteolíticos que cortan el péptido precursor en las subunidades grande y pequeña que constituyen la enzima activa (es un heterotetrámero, con dos subunidades grandes y dos pequeñas). La organización estructural general de las caspasas se esquematiza en la figura 20-2. Tienen un prodominio *N*-terminal, seguido por las secuencias que codifican primero para la subunidad grande y luego para la pequeña. El tamaño del prodominio varía; las caspasas con prodominios grandes en general participan en la iniciación de la apoptosis, por lo que se les clasifica como caspasas inciadoras. Las caspasas con prodominios pequeños participan en la ejecución de la muerte y se denominan efectoras. Aunque la secuencia de los prodominios es más divergente que los segmentos catalíticos, se encuentran dos motivos relacionados en esta región. El llamado "dominio efector de muerte", DED (*death effector domain*) se encuentra en las caspasas-8 y -10, mientras que el "dominio de reclutamiento de caspasas", CARD (*caspase recruitment domain*) se encuentra en las caspasas-1, -2, -4 y -9. Ambos dominios son esen-

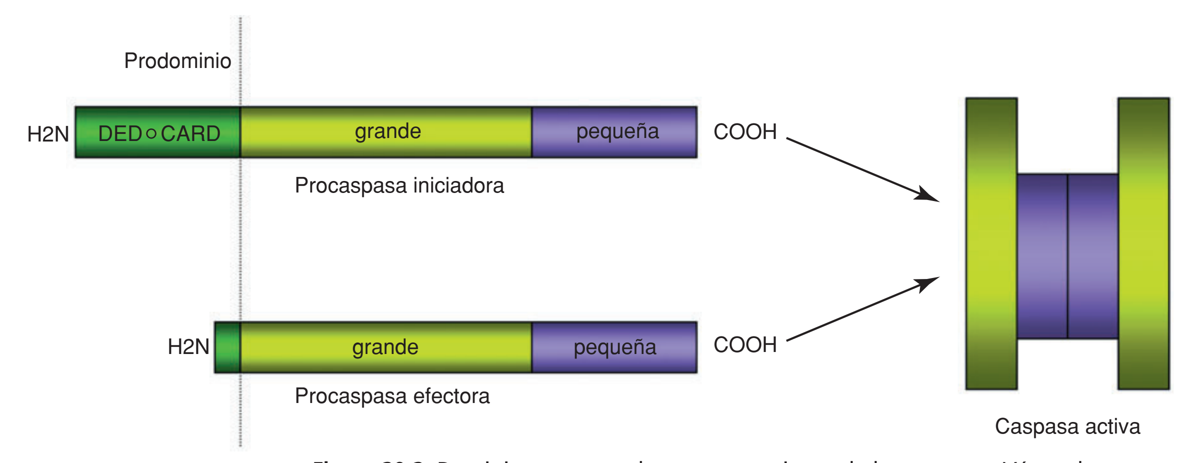


Figura 20-2. Dominios estructurales y procesamiento de las caspasas. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

ciales para la interacción con proteínas adaptadoras (ver más adelante). La clasificación de las caspasas en subfamilias se resume en la tabla 20-1. Todos los cortes que ocurren durante la maduración de las caspasas son en el lado carboxilo del aspártico. Dado que las únicas proteasas eucariontes conocidas con esta especifidad son las mismas caspasas y la serinproteasa granzima B, el corte proteolítico ocurre por autocatálisis, o por una caspasa iniciadora sobre una caspasa efectora (Earshaw y cols., 1999).

Tabla 20-1. Subfamilia de caspasas y su papel en el desarrollo.

Caspasa	Sinónimo	Prodominio	Adaptador	Función
Procesadoras de citoquinas				
Caspasa-1	ICE	-	-	Ratón CASP-1-/- resistente a LPS; deficiente en producción de IL-1b
Caspasa-4	TX, ICH2, ICErII	-	-	Cortada por caspasa-8
Caspasa-5	TY, ICErIII	-	-	
Caspasa-11		-	-	Ratón CASP11-/- resistente a LPS; producción de IL-1a y b bloqueada
Caspasa-13		-	-	
Prodominio grande				
Caspasa-2	Nedd2, ICH1	CARD	RAIDD	Ratones CASP2-/- tienen hiperplasia de células germinales femeninas; menos núcleos de neuronas faciales; células B resistentes a granzima B
Caspasa-8	FLICE, MACH	DED	FADD	Ratones CASP8-/- son letales embrionarios. Resistentes a Fas, DR3, y TNFR; defectos cardiacos y pérdida de precursores hematopoyéticos
Caspasa-9	MCH6, ICELAP6	CARD	APAF1	Ratones CASP9-/- tienen hiperplasia neuronal; células resistentes a etopósido, estaurosporina, UV, etc. Sensibles a Fas y CD3; carencia de activación de caspasas por citocromo c
Caspasa-10	FLICE2, MCH4	DED	FADD	
Prodominio corto				
Caspasa-3	CPP32, YAMA, Apopaína	-	-	Ratones CASP3-/- tienen hiperplasia neuronal; células resistentes a etopósido, estaurosporina, UV y dexametasona
Caspasa-6	MCH2	-	-	
Caspasa-7	MCH3, CMH, ICELAP3	-	-	
Caspasa-12		-	-	
Caspasa-14	MICE	-	-	Pico de expresión al día E17, poca expresión en el adulto. No se corta por otras caspasas

Si bien el gen *ced-3* en *C. elegans* es necesario para la mayor parte de la muerte que ocurre durante su desarrollo, en mamíferos *ice*, el gen que codifica para la caspasa-1, no es suficiente, e inclusive no es el más importante, ya que el ratón mutante con *ice* nulo se desarrolla normalmente y las células de estos animales son susceptibles de morir por apoptosis *in vitro*, a excepción de la muerte mediada por Fas (ver más adelante) (Li y cols., 1995; Kiuda y cols., 1995). Por tanto, otras caspasas participan en la muerte durante el desarrollo. Todos los miembros de las subfamilias caracterizados hasta ahora se expresan en un amplio rango de tejidos y en diferentes etapas de desarrollo (Chinnaiyan y Dixit, 1996). Entre las evidencias que indican que estas proteasas tienen un papel en la apoptosis durante el desarrollo

embrionario están: diversos inhibidores de caspasas evitan la apoptosis de neuronas motoras cuando se añaden a un cultivo primario desprovisto de factores tróficos, y que, al administrar estos inhibidores *in ovo* a embriones de pollo, también se inhibe la muerte natural de tales neuronas motoras, así como la apoptosis que ocurre en las regiones interdigitales durante la formación de los miembros (Milligan y cols., 1995). El papel individual de los genes que codifican para las caspasas se ha determinado mediante el análisis de ratones mutantes que carecen de su expresión (tabla 20-1) (Budihardjo y cols., 1999). Las caspasas-1 y -11 funcionan principalmente en el procesamiento de citocinas, mientras que las caspasas-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10 y -12 participan en la regulación y ejecución de la apoptosis. La función de las otras caspasas está aún por descubrirse.

Un aspecto interesante de la regulación de algunas caspasas, como la caspasa-2, es que, por procesamiento diferencial del mRNA, se generan dos transcritos, uno largo, denominado Ich-1L, que induce apoptosis, y uno corto llamado Ich-1S, diferente en tamaño y secuencia en la región carboxilo adyacente a la secuencia catalítica QACRG, que protege de muerte inducida por ausencia de suero (Wang y cols., 1994). Se han planteado dos posibles mecanismos para explicar el papel de Ich-1S: por un lado, pudiera competir por los mismos blancos que Ich-1L u otros homólogos, pero siendo incapaz de cortarlos y, por otro lado, pudiera inactivar directamente a las caspasas uniéndose a ellas (Gu y cols., 1995). Parece más probable el segundo mecanismo propuesto, ya que se ha observado que uno de los transcritos del gen de caspasa-1 (se han descrito al menos cinco diferentes) codifica para una isoforma denominada Iceε, capaz de ensamblarse con la subunidad p20 de Iceα, y generar un producto catalíticamente inactivo (Alnemri y cols., 1995).

Varios sustratos de las caspasas cooperan durante el proceso apoptótico

Las caspasas son proteasas extremadamente selectivas.

Las caspasas son proteasas extremadamente selectivas. Procesan componentes estructurales clave tanto del citoesqueleto como del núcleo, además de numerosas proteínas que participan en transducción de señales. En algunos casos, el corte proteolítico inactiva a proteínas importantes para la sobrevivencia celular, mientras que en otros la digestión convierte a una proteína benigna en una promotora de apoptosis. A continuación se resume el tipo de sustratos identificados, agrupándolos de forma que facilite darle un sentido al vasto número de proteínas que son cortadas por caspasas.

Activación de proteínas cinasas que promueven la muerte celular

Se conocen al menos 13 proteínas cinasas que se procesan durante la apoptosis. Muchas de ellas son cortadas en el dominio regulatorio, liberando un fragmento con actividad catalítica mayor. Por ejemplo, la digestión de

Mekk1, Pak2 y Mst1/Krs produce cinasas constitutivamente activas y, cuando se sobreexpresan los fragmentos generados por proteólisis en células, inducen apoptosis. Por lo contrario, versiones mutantes que carecen de actividad catalítica previenen la apoptosis, apoyando la idea de que estas cinasas activan componentes esenciales para la muerte. Estas tres proteínas activan a un grupo de cinasas conocidas como proteínas activadas por estrés (Sapk/Jnk), que a su vez activan al factor de transcripción c-Jun. Al menos en el caso de neuronas, la progresión de la muerte depende de la transcripción de genes, por lo que c-Jun podría regular la expresión de genes proapoptóticos. Algunos miembros de la familia de las proteínas cinasa C (Pkc) también son partidos y activados por caspasas, como Pkcδ y Pkcθ. Nuevamente, la expresión de los fragmentos de estas cinasas generadas inducen apoptosis.

Las caspasas también activan a un grupo de proteínas importantes en la regulación del ciclo celular conocidas como cinasas dependientes de ciclinas (*cdk, ciclin dependent kinases*) mediante tres mecanismos. El primero involucra la inactivación la cinasa *wee1*, que cataliza la inhibición por fosforilación de *cdk*1 y *cdk*2 durante la interfase del ciclo celular. El segundo mecanismo es mediante la ruptura y consecuente inactivación de CDC27, una proteína que promueve la progresión del ciclo celular hacia la anafase, al degradar a las ciclinas mitóticas. El tercer mecanismo es la digestión e inactivación de proteínas inhibidoras de *cdk*, como p21Cip1/Waf1 y p27kip1.

Rompimiento de proteínas asociadas al citoesqueleto eliminando vías de sobrevivencia

En los organismos pluricelulares las células están adheridas entre sí y a la matriz extracelular, para darle estructura a los tejidos. Cuando las células se desprenden, se desencadena la muerte celular, ayudando así a prevenir el surgimiento del cáncer. Las células se mantienen adheridas a través de focos de contacto que contienen actina, integrinas y matriz extracelular. Cuando las células pierden los contactos, se rompen señales de sobrevivencia. Una de estas vías de sobrevivencia parece ser iniciada por la proteína Fak, que desencadena una cascada de fosforilación que culmina en la activación de Akt, una cinasa que inhibe directamente a la maquinaria de apoptosis, ya que fosforila e inactiva a la proteína proapoptótica Bad (ver más adelante). Algunos ejemplos de proteínas del citoesqueleto que son cortadas por caspasas durante la apoptosis son actina, α-fodrina, paxilina y citoqueratina 18. Vale la pena mencionar que las mismas cinasas Fak y Akt también son degradadas por las caspasas, de manera que se asegura la inhibición de la cascada de sobrevivencia.

Desmembramiento de redes de monitoreo del daño celular

Todas las células tienen mecanismos elaborados para detectar el daño al DNA ocasionado por el ambiente, y retrasan el ciclo celular para dar tiem-

po a la maquinaria de reparación de corregir los daños. Entre las proteínas más importantes que detectan el estado del genoma y regulan el ciclo celular están los supresores tumorales p53 y Rb. Ambas proteínas son destruidas durante la apoptosis en algunos tipos celulares. En el caso de Rb, después de ser cortado por una caspasa, pierde la capacidad de unirse a la proteína Mdm2, que es un regulador negativo de p53. De esta manera aumenta la disponibilidad de Mdm2 para unirse a p53 e inducir su degradación. Mdm2 a su vez es cortada también por caspasas, pero el fragmento generado mantiene la capacidad de interactuar con p53 e inducir su eliminación. El resultado neto es la eliminación de p53, con lo cual ya no puede inducir la transcripción de genes como p21Cip1/Waf1, el que detiene el ciclo celular. En otros casos, sin embargo, la activación de p53 es necesaria para la activación de la muerte (ver más adelante).

No sólo las proteínas que participan en la señalización para activar la maquinaria de reparación, sino también proteínas efectoras, se cortan durante la apoptosis. Tal es el caso de Parp, DNA-PKc y hsRad51. Por ejemplo, células HeLa en las cuales experimentalmente se impide el funcionamiento de Parp por medio de la expresión de una variante dominante negativa (es decir, una forma mutante que interactúa con la proteína silvestre y la inactiva), se vuelven más sensibles a agentes inductores de muerte y algunas líneas incluso sufren apoptosis espontáneamente (Schreiber y cols., 1995). No obstante, el ratón mutante nulo en *Parp*, aun cuando se vuelve más sensible al estrés ambiental, se desarrolla normalmente (Wang y cols., 1995). De esta manera, se asegura que durante la muerte celular se apague la respuesta de defensa.

Desensamblaje del núcleo

Una de las características distintivas de la apoptosis es la fragmentación del DNA en multímeros de nucleosoma y la fragmentación del núcleo. La nucleasa que degrada al DNA internucleosomalmente, llamada Cad/Cpan/Dff40, se activa por proteólisis mediada por caspasa (Enari y cols., 1998). Para desensamblar la membrana nuclear, proteínas como las láminas y NuMA se cortan también durante la apoptosis.

Actualmente hay dos vías alternativas para activar a las caspasas: una es iniciada por señales externas al activar a un receptor de muerte en la superficie celular, denominada vía extrínseca, y la otra es disparada por cambios en la integridad mitocondrial, denominada vía intrínseca.

El "dominio de muerte" (DM) es característico de algunas proteínas activadoras de la MCP (la activación de las caspasas por la vía extrínseca)

Reaper (*Rpr*), *head involution defective* (*Hid*) y *Grim* son genes que, mediante análisis génico, han mostrado ser necesarios y suficientes para inducir la MCP durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. Los ge-

nes *Hid* y *Grim* codifican para proteínas cuya secuencia no tiene similitud con las notificadas a la fecha y se desconoce su mecanismo de acción. *Rpr*, por otro lado, no forma parte de la maquinaria de muerte, ya que células carentes de *Rpr* aún son capaces de morir por apoptosis en respuesta a dosis altas de rayos X. Durante la embriogénesis, el patrón de expresión de los tres genes coincide con zonas de muerte celular; en particular, *Rpr* y *Grim* se expresan en las células destinadas a morir horas antes de que se observe algún rasgo de apoptosis, y basta su presencia en embriones transgénicos para inducir muerte extensivamente, siendo *Grim* capaz de inducir la MCP en la etapa de desarrollo más temprana. Considerando estos datos, y puesto que la carencia de *Rpr* o *Grim* evita la muerte de diferentes tipos celulares y en diferentes etapas del desarrollo, se postula que funcionen en la iniciación del programa de muerte, en un punto convergente de diferentes vías de activación (White y cols., 1994). En concordancia, *Rpr*, *Hid* y *Grim* participan más arriba en la cascada de las caspasas, ya que la muerte inducida por estas proteínas se protege por inhibidores de caspasas, como p35 (White y cols., 1996; Grether y cols., 1995). Estos tres genes se encuentran localizados en una misma región en el cromosoma, se transcriben en una misma dirección y comparten similitud en los primeros 14 residuos del extremo amino, siendo más parecidos *Rpr* y *Grim* entre sí (Chen y cols., 1996).

Rpr codifica para una proteína citoplásmica que tiene cierto parecido con otras proteínas en un dominio, consistente en aproximadamente 70 aminoácidos, conocido como el "dominio de muerte" (DM). El DM se encuentra en proteínas de mamífero, muchas de las cuales también participan en la activación de la muerte, tales como los receptores membranales Tnfr-1, Fas, CD40 y la familia Trail (DR4 y DR5). Colectivamente se han denominado receptores de muerte, ya que comparten la cualidad de inducir apoptosis cuando son activados por la unión de sus ligandos o anticuerpos agonistas. El DM de estas proteínas media la oligomerización de los receptores y es esencial para la inducción de la muerte, ya que mutaciones en esta región suprimen ambas actividades. De manera análoga, la activación de *Rpr* involucra una oligomerización (Schreiber y cols., 1995).

Los ligandos que activan a los receptores de muerte están estructuralmente relacionados entre sí, y pertenecen a la superfamilia de TNFα. Los más estudiados son el ligando de Fas (FasL) que se une a Fas, y TNFα que se une a TNFR-1. Cuando estos receptores son activados por su ligando, ocurren tres pasos distintivos: la trimerización del receptor; el reclutamiento de proteínas intracelulares asociadas al receptor que funcionan como adaptadores, y la iniciación de la activación de caspasas.

Los ligandos que activan a los receptores de muerte están estructuralmente relacionados entre sí, y pertenecen a la superfamilia de TNFα.

En el caso de Fas, la unión de su ligando induce la trimerización de Fas. La región citoplásmica que contiene el DM recluta a una proteína adaptadora denominada Fadd (*fas-associating protein with death domain*), que también contiene un DM en la región carboxilo-terminal. La interacción entre ambas proteínas ocurre a través de sus respectivos DM y, si se introducen experimentalmente mutaciones puntuales en estos dominios, se rompe la interacción y se inhibe la muerte. La proteína adaptadora que se une a TNFR-1 se llama Tradd (*TNF-receptor associated death domain*); aunque también recluta otras proteínas que contienen DM como Rip (*receptor in-*

teracting protein), que a su vez recluta a Raidd. Fadd tiene en su extremo *N*-terminal un dominio DED, a través del cual interactúa y recluta caspasas iniciadoras como procaspasa-8 y -10. La procaspasa-8 tiene dos regiones DED en su prodominio, que usa para interactuar con Fadd, mientras que en la región C-terminal contiene una región de similitud con las caspasas. Si bien la procaspasa-8 tiene muy poca actividad, inmediatamente después de su reclutamiento se procesa proteolíticamente a la forma activa. La caspasa-8, una vez activada, procesa a los zimógenos de caspasas efectoras como procaspasa-3, -6 y -7, para ejecutar la muerte celular. Es decir, que la activación de la muerte se lleva a cabo a través de una cascada de proteólisis (figura 20-3). La proteína Raidd tiene un dominio CARD en su extremo amino-terminal, que le permite interactuar con el homodominio presente en caspasa-2. De esta manera sirve como un adaptador entre las caspasas y el complejo de receptor activado (Duan y Dixit, 1997).

Un mecanismo alternativo para activar la maquinaria de muerte puede ser mediante la activación de una enzima con DM; la primera enzima descrita hasta el momento que contiene un DM es la cinasa DAP, que también

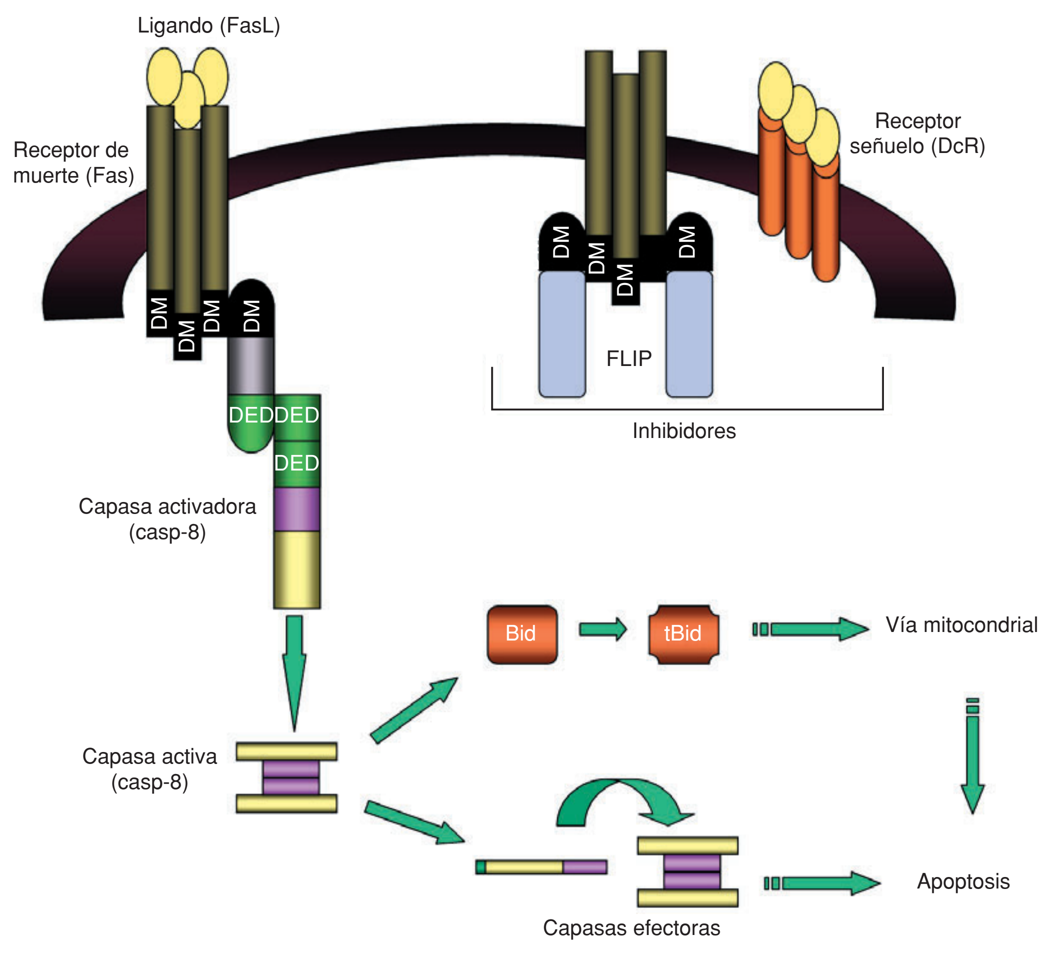


Figura 20-3. Activación de las caspasas por la vía extrínseca. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

activa la muerte celular y la reducción de su expresión confiere resistencia a las células que son sensibles al interferón-γ (Deiss y cols., 1995).

Diferentes mecanismos regulan la activación de la apoptosis por los receptores de muerte

La activación de la muerte mediante la activación de los receptores de muerte se puede regular por tres mecanismos diferentes. El primer mecanismo evita el reclutamiento de los miembros del complejo activado del receptor, mediante la unión de proteínas que también contienen dominios DED, y compiten con la unión de las procaspasas a Fadd (figura 20-3). La primera proteína descrita es de origen viral y se denominó v-FLIP (*fadd-like ICE inhibitory protein*), contiene dos dominios DED y pertenece a una familia de proteínas. El homólogo en mamíferos, c-Flip, se descubrió por varios laboratorios, por lo que se le conoce también como Casper, I-Flice, Flame, Cash o Merit. Cuando *c-Flip* se sobreexpresa, las células se vuelven resistentes a estímulos apoptóticos que activan receptores de muerte, pero no a otros estímulos apoptóticos como estaurosporina o radiación ultravioleta, que activan la muerte por una vía distinta.

Cuando *c-Flip* se sobreexpresa, las células se vuelven resistentes a estímulos apoptóticos que activan receptores de muerte.

El segundo mecanismo para inhibir la activación de los receptores de muerte es mediante la expresión de receptores señuelo, que interactúan con el ligando, pero carecen del dominio citoplásmico para formar el complejo activado. Los primeros receptores señuelo identificados se parecen a los receptores Trail: DR4 y DR5; uno de ellos carece del dominio citoplásmico por completo (DcR1), mientras que el otro contiene el DM truncado (DcR2). Ambos inhiben específicamente la muerte inducida por el ligando de Trail, al secuestrarlo e impedir su interacción con DR4 y DR5. Recientemente se identificó un tercer receptor (DcR3) que une específicamente el ligando de Fas (figura 20-3). Es interesante notar que DcR3 está amplificado en células cancerosas de colon y de pulmón, lo que permite especular que la sobreexpresión de DcR3 podría ser un mecanismo para evadir al sistema inmune, resistiendo la muerte provocada por linfocitos citotóxicos (Pitti y cols., 1998).

El tercer mecanismo para bloquear la señal activada por receptores de muerte es a través de inhibir directamente la activación de las procaspasas iniciadoras. Por ejemplo, la proteína CrmA (descrita anteriormente) inhibe tanto la autoproteólisis de procaspasa-8 para activarse, como el procesamiento de sustratos de caspasa-8 ya activada que conllevan a la ejecución de la muerte.

Recientemente se identificó una proteína "silenciadora de DM" denominada Sodd (*silencer of death domains*). En ausencia de TNFα, Sodd se asocia a TNFR-1 y evita la señalización espontánea de los receptores de muerte (Jiang y cols., 1999).

La mitocondria es un sitio común para iniciar la activación de las caspasas (la activación de las caspasas por la vía intrínseca)

Como mencionamos anteriormente, las caspasas existen en las células en su forma inactiva. Para la ejecución de la muerte, las procaspasas

efectoras tienen que ser activadas por proteólisis. Esto ocurre de dos maneras: a través de proteínas adaptadoras (como se describió anteriormente), o mediante la acción proteolítica de otras proteínas, usualmente caspasas mismas. Ésta es la principal manera de activar caspasas efectoras.

Multitud de estímulos apoptóticos convergen en la activación de caspasas efectoras a través de la denominada vía mitocondrial. Esta vía fue descubierta mediante fraccionamientos bioquímicos y experimentos de reconstitución *in vitro*, en los que se identificaron tres proteínas necesarias y suficientes para la activación de caspasa-3, la principal caspasa efectora. La primera proteína caracterizada es el citocromo *c*. Interesantemente, sólo el holocitocromo *c*, y no el apocitocromo *c* recién sintetizado en el citosol, es capaz de activar a las caspasas efectoras. Este dato sugirió que el citocromo *c* que participa en la activación de la caspasas debía provenir de la mitocondria. De hecho, se ha demostrado la translocación de citocromo *c* de la mitocondria al citoplasma en células que mueren por apoptosis inducida por una variedad de estímulos, tales como agentes que dañan al DNA, inhibidores de cinasas y la activación de receptores de muerte. Una vez liberado el citocromo *c* en el citoplasma, interactúa con otros dos factores proteicos, Apaf-1 y procaspasas-9, para activar a la caspasa-3 (figura 20-4).

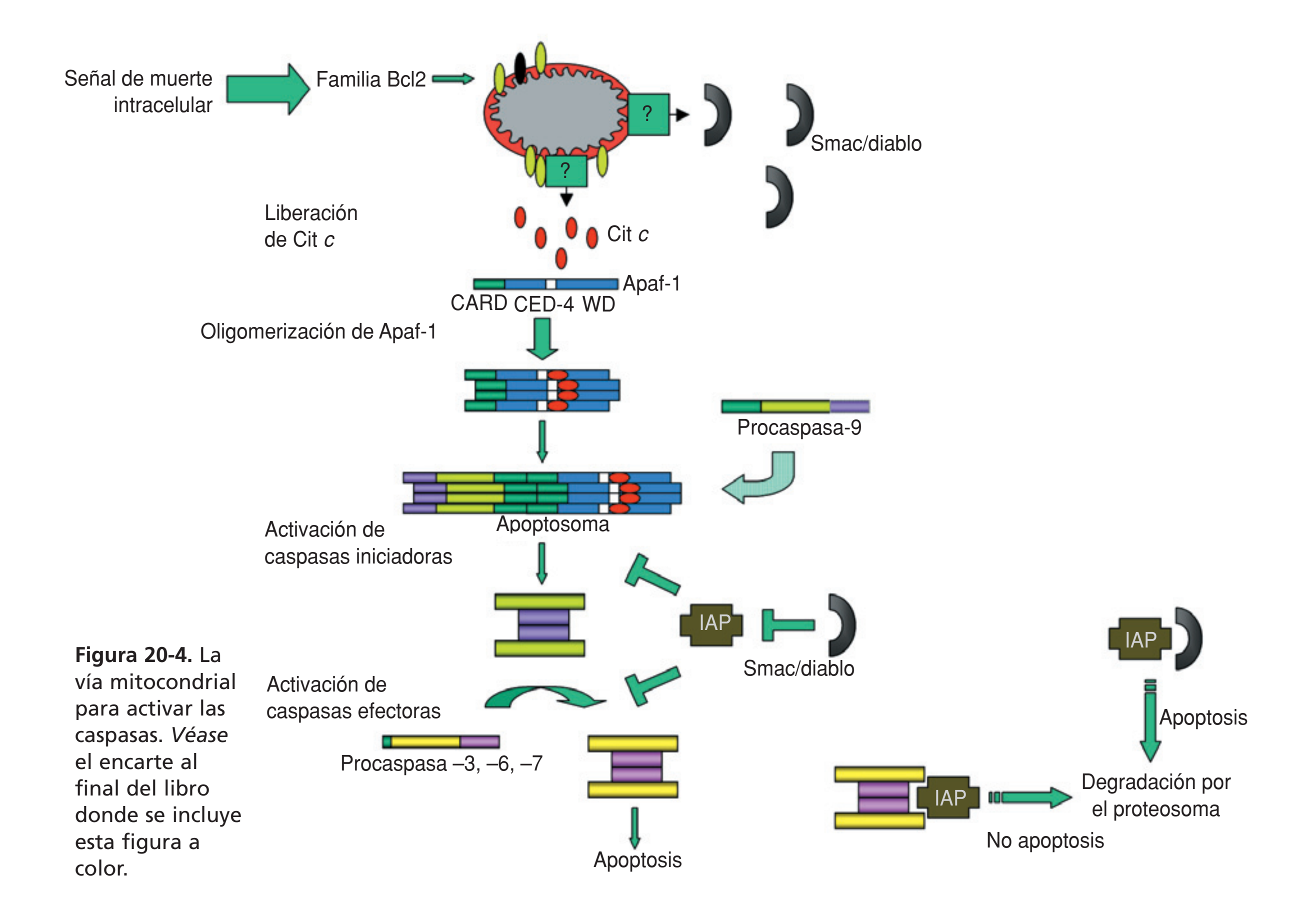


Figura 20-4. La vía mitocondrial para activar las caspasas. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

Apaf-1 es una proteína que consiste en 3 dominios. Tiene un dominio CARD (descrito anteriormente) en el extremo amino-terminal, que le permite interactuar específicamente con la procaspasa-9. En la región media presenta 50% de similitud con la secuencia primaria de CED-4, la proteína proapoptótica de *C. elegans* que discutimos con anterioridad. Dentro de esta región conservada se encuentra un dominio de unión a nucleótidos, esencial para la función tanto de Apaf-1 como de CED-4. Mutaciones en este dominio que destruyen la unión de ATP/dATP no pueden inducir la apoptosis. En la región carboxilo-terminal, Apaf-1 tiene varias repeticiones del dominio de interacción de proteínas WD-40, esencial para regular la interacción de Apaf-1 con la procaspasa-9.

La formación de un complejo multimérico Apaf-1/citocromo *c* representa el paso de compromiso para la activación de procaspasa-9, la cual es reclutada en el complejo que forma el denominado "apoptosoma". La procaspasa-9 se activa por autocatálisis y se libera del complejo para procesar y activar caspasas efectoras como las caspasa-3, -6 y -7.

La formación de un complejo multimérico Apaf-1/citocromo *c* representa el paso de compromiso para la activación de procaspasa-9.

Mediante el estudio de ratones con mutaciones nulas en los genes de Apaf-1, caspasa-3 y caspasa-9, se ha comprobado *in vivo* que la activación de la caspasa-3 se inicia por un daño a la mitocondria que permite la liberación de citocromo *c*, el cual se acompleja con Apaf-1 y activan a caspasa-9. El fenotipo de los ratones que no expresan Apaf-1, caspasa-3 o caspasa-9 es muy parecido. Todos tienen un número excesivo de neuronas, tanto progenitoras como maduras y mueren durante los dos primeros días de nacidos. Además, en el ratón mutante en Apaf-1, no se activan las caspasas-3 y -9 en respuesta a una variedad de estímulos, aunque la liberación de citocromo *c* aún ocurre. De la misma manera, no hay activación de caspasa-3 en el ratón mutante en el gen de caspasa-9.

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis (Iap) regulan la activación de las caspasas por la vía mitocondrial

La función de las caspasas efectoras está regulado por otro grupo de proteínas, las Iap (*inhibitory of apoptosis proteins*). Esta familia de proteínas fue originalmente identificada en el baculovirus y bloquea la muerte provocada por diferentes estímulos. En *Drosophila* se han identificado dos genes, denominados *Diap1* y *Diap2*, cuya actividad protectora se demostró al expresarlas en moscas transgénicas, donde evitaron tanto la MCP, como la muerte provocada por la sobreexpresión de genes que matan, como *Rpr* o *Hid (*Hay y cols., 1995*)*. En mamíferos se han identificado al menos cinco genes que codifican para proteínas semejantes a Iap. Cuatro de ellas, c-Iap-1 (Duckett y cols., 1996), c-Iap-2, Xiap y Niap consisten en un dominio amino-terminal que contiene múltiples copias del motivo de baculovirus denominado BIR (*baculovirus IAP repeat*). Este dominio es necesario y suficiente para que las IAP interactúen con las caspasas, inhibiendo su actividad. En el extremo carboxilo-terminal tienen un dominio de unión a zinc denominado *RING finger*, que funciona como una ligasa de ubiquitina, promoviendo la degradación por proteosoma al menos en XIap (Yang

y cols., 2000), y tal vez de la caspasa asociada a éste (figura 20-4). El quinto miembro de la familia se llama survivín y contiene sólo dominios BIR.

Al igual que sus homólogos virales y de dípteros, las Iap de mamífero inhiben la apoptosis inducida por una variedad de estímulos. Xiap, c-Iap-1, y c-Iap-2 unen a las caspasas-3 y -7 activas, inhibiéndolas. También se unen a la procaspasa-9 y evitan su activación. El patrón de expresión de las Iap varía dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, survivín se expresa en niveles más altos en una variedad de tumores respecto a células normales. De estos genes, *Niap* es el más interesante, pues es la causa génica de la atrofia del músculo espinal, enfermedad en la cual se mueren por apoptosis neuronas motoras (Roy y cols., 1995; Liston y cols., 1996).

Smac/diablo es liberada de la mitocondria junto con el citocromo *c* en respuesta al estímulo apoptótico.

Una nueva proteína denominada Smac/diablo ejerce un segundo nivel de control de la apoptosis. Es liberada de la mitocondria junto con el citocromo *c* en respuesta al estímulo apoptótico, y su función es promover la activación de las caspasas al asociarse a las Iap y prevenir su acción (figura 20-4). De esta manera, en respuesta al estímulo apoptótico, Smac/diablo y el citocromo *c* son liberados coordinadamente (por un mecanismo que aún no se entiende); Apaf-1 se activa, la caspasa-9 se inhibe por Iap, Smac/diablo libera la inhibición y la apoptosis continúa. Aún no se entiende por qué existen dos niveles de control de la apoptosis, pero el descubrimiento de estas proteínas ayuda a explicar algunos datos que eran difíciles de interpretar. Por ejemplo, la microinyección del citocromo *c* activa las caspasas e induce apoptosis en varios tipos de células, excepto las neuronas. En este caso, es necesario desproveerlas de factores neurotróficos para que se vuelvan susceptibles de morir por inyección de citocromo *c*. Esto generó el concepto de "competencia para morir", que se podría explicar por la ausencia de Smac/diablo y la presencia de Iap en las neuronas (Green, 2000).

La familia de CED-9/Bcl-2

La familia de Bcl-2 regula la iniciación de la activación de las caspasas por la vía mitocondrial

Como se mencionó anteriormente, la iniciación de la cascada proteolítica que ejecuta la muerte celular requiere del ensamblaje de ciertas procaspasas en un andamiaje proteico, el apoptosoma, y la familia de Bcl-2 determina si este complejo se forma o no. Los miembros de la familia de Bcl-2 se clasifican en dos tipos: los antiapoptóticos y los proapoptóticos. Los miembros antiapoptóticos secuestran proteínas del proteosoma y evitan la liberación de moléculas apoptogénicas de organelos como la mitocondria. Los miembros proapoptóticos, por su parte, actúan como centinelas del daño celular: en respuesta a señales externas se translocan a organelos donde interactúan con miembros antiapoptóticos y provocan daño en el organelo, desencadenando la apoptosis.

Los miembros de la familia de Bcl-2 se clasifican en dos tipos: los antiapoptóticos y los proapoptóticos.

La familia de Bcl-2 regula una vía de muerte que se encuentra en organismos tan variados como nemátodos, la mosca de la fruta y mamíferos (figura 20-5). En *C. elegans, ced-9* antagoniza la función de *ced-3* y *ced-4*

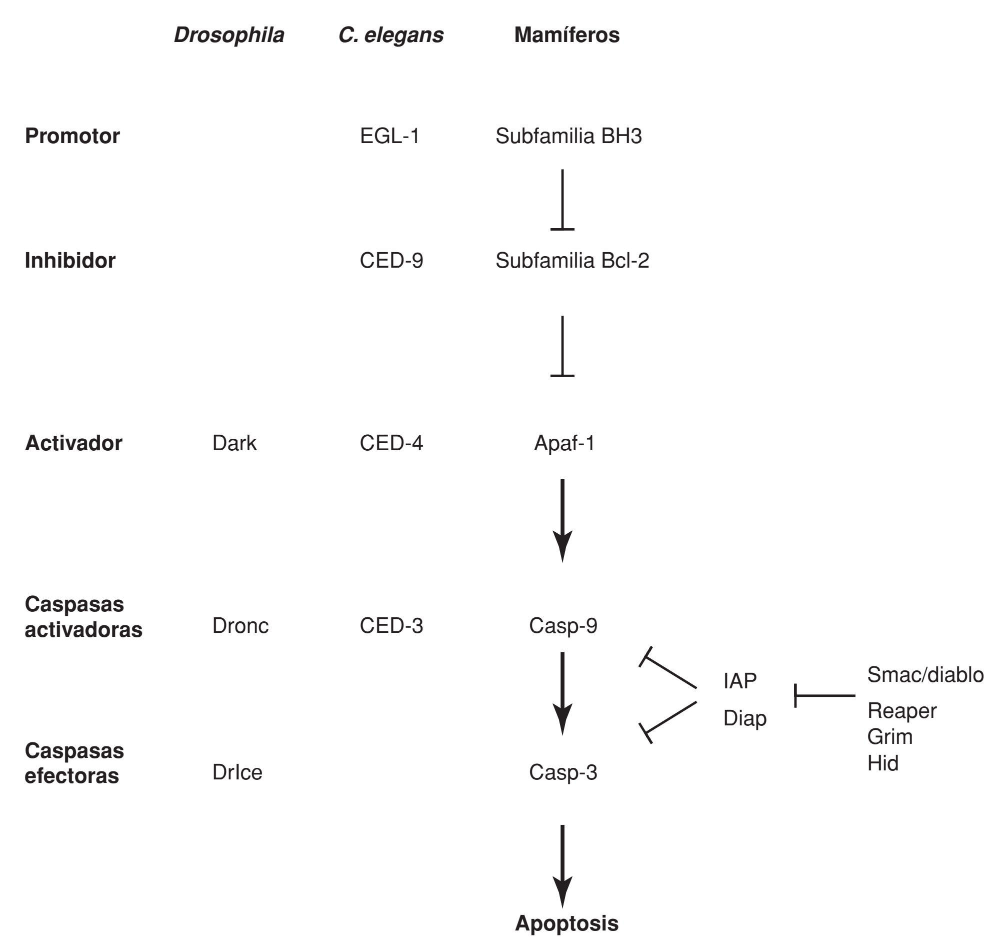


Figura 20-5. La cascada de muerte está conservada en la evolución.

(mencionados anteriormente), bloqueando la muerte celular. *bcl-2* es un gen mamífero homólogo a *ced-9*, ya que la expresión de *bcl-2* humano en *C. elegans* disminuye la MCP (Vaux, y cols., 1992) y, viceversa, la sobreexpresión de *ced-9* actúa negativamente sobre la muerte de células de mamífero.

En los últimos años ha habido gran cantidad de notificaciones demostrando la capacidad de Bcl-2 de inhibir la muerte en diversos tipos celulares y en respuesta a una variedad de estímulos, con pocas excepciones (tabla 20-2) (Reed, 1994).

El patrón de expresión de *bcl-2* durante el desarrollo del ratón, específicamente en el sistema nervioso (Merry y cols., 1994) y en las extremidades, está de acuerdo con la noción de que *bcl-2* tiene un papel importante en la regulación de la apoptosis. En el adulto se restringe su expresión a tejidos que requieren tiempos largos de sobreviviencia, como las células troncales del sistema hematopoyético, las neuronas posmitóticas y las de zonas proliferativas (Hockenberry y cols., 1991). Por lo tanto, una ganancia o pérdida en la función de *bcl-2* debiera manifestar alteraciones importantes en ratones transgénicos. Efectivamente, la sobreexpresión de

Tabla 20-2. Causas de muerte evitable e inevitable por Bcl-2.

Causas de muerte evitable por Bcl-2	
Drogas quimioterapéuticas	Glutamato
Radiación gamma y UV	Calcio
Estrés calórico	Remoción de glucosa
Sindbis y Baculovirus	Remoción de factores de crecimiento
Especies reactivas de oxígeno	Remoción de factores neurotróficos
p53	Factor de crecimiento tranformante b
c-Myc	Algunas células T citolíticas
Factor de necrosis tumoral α	Azida
Mutantes en Ced-9 de *C. elegans*	
Causas de muerte inevitable por Bcl-2	
Algunas células T citotóxicas	Proteína β amiloide
Selección negativa de timocitos	Algunas neuronas dependientes de CNTF
Lisis mediada por complemento	Muerte activada por receptores de muerte como Fas

bcl-2 en el sistema linfoide extiende la sobrevivencia normal de células B (Nuñez y cols., 1991) y produce linfomas (McDonnell y cols., 1989), mientras que la expresión dirigida a precursores neuronales aumenta en 30% el número de neuronas generado en el ratón adulto, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (Farlie y cols., 1995). Sin embargo, contrario a lo esperado, el ratón mutante con un *bcl-2* no funcional completa el desarrollo embrionario, presentando apoptosis masiva sólo en el timo y el bazo, a pesar de que el inicio de la hematopoyesis es normal (Veis y cols., 1993).

Una explicación a esta aparente irrelevancia de *bcl-2,* durante el desarrollo embrionario, es que en esta etapa se expresen genes homólogos que estén sustituyendo su función, o bien, puesto que Bcl-2 se aisló originalmente de células del sistema inmune, que existan variantes para diferentes tipos celulares. De hecho, actualmente se han identificado varios genes con similitud estructural que han permitido establecer una familia de proteínas relacionadas.

Miembros de la familia de Bcl-2 actúan tanto negativa como positivamente sobre la apoptosis

Por medio de alineamientos múltiples de los genes relacionados a *bcl-2,* se han identificado cuatro regiones conservadas en la región codificante, denominadas regiones de homología a Bcl-2 1, 2, 3 y 4 (BH1, BH2, BH3 y BH4). Los miembros de la familia Bcl-2 se catalogan en tres subfamilias: la subfamilia de Bcl-2, cuyos miembros actúan como inhibidores de apoptosis, contienen los cuatro dominios BH1 a BH4. Su característica distintiva es la presencia el dominio BH4, necesario para su función antiapoptótica. Algunos miembros de este grupo son Bcl-2, Bcl-X_L, A1, Boo, Bcl-w, Mcl-1.

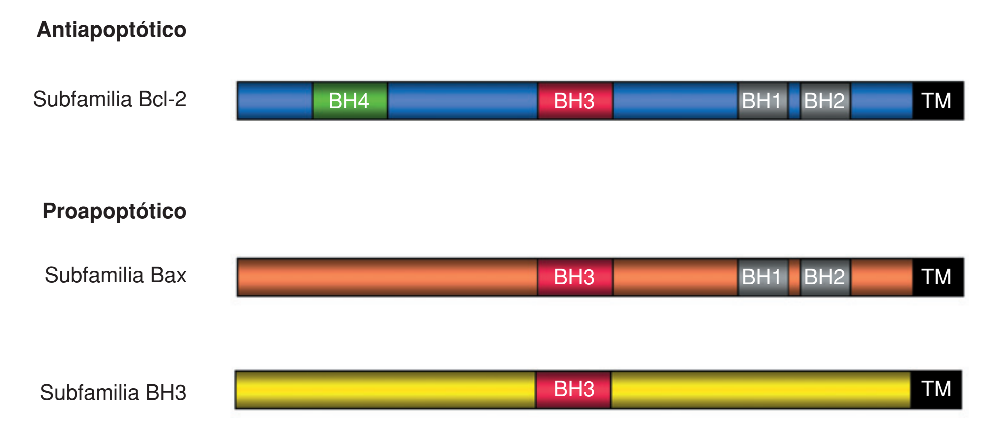


Figura 20-6. La familia de Bcl-2 se subdivide en tres subfamilias, de acuerdo con el contenido de dominios BH. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

La subfamilia Bax (representada por Bak y Bok, además de Bax) actúa como promotora de la apoptosis y sus miembros presentan sólo los dominios BH1-3. Carecen del dominio BH4. El dominio BH3 es esencial para promover la muerte, pues mutaciones que remueven este dominio eliminan la actividad proapoptótica. La tercer subfamilia está compuesta por genes cuya única similitud en secuencia con la familia Bcl-2 es la presencia del dominio BH3, siendo completamente diferentes en el resto de la secuencia. Esta subfamilia también es proapoptótica, y el dominio BH3 es indispensable para su función. Algunos miembros de esta subfamilia son Bim, Bik, Bad, Bid, Harakiri y Noxa (Adams y Cory, 2001) (figura 20-6).

La subfamilia Bax (representada por Bak y Bok, además de Bax) actúa como promotora de la apoptosis y sus miembros presentan sólo los dominios BH1-3.

Los miembros de la familia de Bcl-2 interactúan entre sí

Los experimentos de mutagénesis en los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 indican que éstos se requieren para la interacción entre distintos miembros de la familia de Bcl-2 u otras proteínas que tienen efectos funcionales importantes. Por ejemplo, BH1 y BH2 son fundamentales para la mayoría de las interacciones entre los miembros de esta familia; la región BH3 de Bax, por otro lado, es suficiente para inducir la muerte, mientras que la región BH4 de Bcl-2 es indispensable para proteger, aun cuando no se requiere para dimerizar con Bax o Bcl-2 mismo (Hanada y cols., 1995). A pesar de la homología en la secuencia de los dominios BH1 y BH2, éstos confieren una especificidad de interacción, ya que no todas las combinaciones de heterodímeros entre las moléculas identificadas es posible. Hay una preferencia de interacción entre miembros antiapoptóticos con miembros proapoptóticos.

Los miembros de la subfamilia BH3 no homodimerizan, lo que sugiere que su función es competir por los protectores de muerte Bcl-2, quizá aumentando las concentraciones de la subfamilia Bax. De hecho, experimentos *in vitro* han demostrado que Bad interactúa con el heterodímero Bcl-X_L/Bax, desplazando a Bax y permaneciendo asociada a Bcl-X_L (Yang y cols., 1995). En este contexto, Bad funcionaría como un inductor de muerte al liberar

Los miembros de la subfamilia BH3 no homodimerizan.

a las proteínas Bax y Bak, que homodimerizan y matan. Experimentos de mutagénesis apoyan también esta noción, ya que mutantes de Bcl-2 que pierden la capacidad de interactuar con Bax, pero que siguen teniendo la capacidad de homodimerizar, también pierden la habilidad de bloquear la muerte (Yin y cols., 1994).

La subfamilia BH3 parece ser guardiana del daño celular y crítica para desencadenar la apoptosis. En *C. elegans* también hay un representante de esta subfamilia que se requiere para la MCP, denominado EGL-1. Tal parece que los diferentes miembros de la subfamilia BH3 responden a estímulos particulares, activando la muerte en circunstancias o tejidos específicos. Por ejemplo, ratones mutantes que carecen de Bim tienen un exceso de leucocitos y mueren de enfermedades autoinmunes. En cambio, ratones mutantes que no producen Bid son aparentemente normales, aunque sus hepatocitos son más resistentes a la muerte. Dado que son tan potentes inductores de muerte, hay varios mecanismos para mantenerlos bajo control. Algunos se regulan a nivel transcripcional, como *egl-1*, *hrk* o *noxa*, cuya expresión se induce en respuesta a estímulos apoptóticos. Otros a través de modificaciones postraduccionales como Bid, que se mantiene inactivo hasta que es cortado por una caspasa generando el fragmento tBid o Bim, que es secuestrado en los microtúbulos al interactuar con la dineína LC8. Bad es un ejemplo de regulación de la actividad por fosforilación. Cuando está desfosforilado, se asocia a Bcl-$X_L$en la mitocondria y promueve la muerte. En cambio, al ser fosforilada se encuentra en el citoplasma asociada a la proteína 14-3-3, que se une a proteínas fosforiladas en serinas, y pierde la capacidad de intractuar con Bcl-X_L. La cinasa Akt (mencionada anteriormente) es responsable de la forsforilación e inactivación de Bad.

La proteólisis podría ser otro mecanismo postraduccional para regular la actividad de los miembros de la familia de Bcl-2. Durante la progresión del SIDA, los timocitos CD4 mueren por apoptosis como consecuencia de la actividad de la proteasa de HIV, pues degrada a Bcl-2 generando dos fragmentos inactivos. Resulta interesante que el sitio de corte se realiza adyacente a la fenilalanina 112, pues este residuo está conservado a lo largo de la evolución en todos los homólogos de Bcl-2, incluyendo CED-9. Esto sugiere que la proteólisis podría ser un mecanismo de activación de la apoptosis, considerando, además, que Bax no tiene conservado ese residuo ni es cortada por la proteasa de HIV (Strack y cols., 1996).

La subfamilia de Bcl-2 se encuentra preponderantemente en la mitocondria y regula la activación de las caspasas

La mayoría de los miembros de las subfamilias Bcl-2 y Bax presentan un segmento hidrofóbico en el extremo carboxilo-terminal, el cual facilita su interacción con las membranas de retículo endoplásmico y la envoltura nuclear, así como con la membrana externa de la mitocondria, donde los miembros antiapoptóticos normalmente residen, mientras que los miembros proapoptóticos se ensamblan durante la apoptosis. Por microscopia electrónica se ha determinado que Bcl-2 está localizada en parches, tanto en la membra-

na nuclear como en el retículo endoplásmico, semejando la imagen proyectada por los poros nucleares (Monaghan y cols., 1992; Krajewski y cols., 1993). La relevancia de la localización mitocondrial de Bcl-2 en su actividad antiapoptótica se pone de manifiesto cuando se remueve la región transmembranal (TM) de Bcl-2, lo que provoca que la proteína mutante se localice en el citoplasma y disminuya su eficiencia para evitar la apoptosis. Además, si se sustituye la región TM de Bcl-2 por una región de localización específica para retículo endoplásmico, pierde la capacidad de evitar la muerte provocada por la ausencia de suero. Pero acorde a lo esperado, si se sustituye por la región TM de la proteína mitocondrial ActA, Bcl-2 recupera su actividad. Sin embargo, en algunos tipos de inducción de muerte es suficiente la localización de Bcl-2 en el retículo endoplásmico, como en la muerte inducida por la sobreexpresión de *c-myc* en ausencia de suero (Zhu y cols., 1996).

Hay cada vez más evidencia de que la presencia de Bcl-2 en la mitocondria regula su homeostasis e integridad. Cuando *bcl-2* es sobreexpresado, se evitan los disturbios mitocondriales asociados a la apoptosis, como el cambio de pH, de permeabilidad de la membrana y la ruptura de la integridad de la membrana externa.

Como se mencionó anteriormente, el espacio intermembranal de la mitocondria alberga varias proteínas apoptogénicas y su escape desencadena la muerte celular. La primera de estas proteínas identificadas fue el citocromo *c*, que es un cofactor necesario para que Apaf-1 favorezca la activación de caspasa-9, mediante la formación del apoptosoma. Otras moléculas que también escapan de la mitocondria son Smac/diablo y la flavoproteína AIF (*apoptosis inducing factor*). La presencia de Bcl-2 en la mitocondria evita dicho movimiento, pero, si experimentalmente se añade citocromo *c* al citosol, Bcl-2 ya no puede evitar la muerte. Por lo tanto, se postula que el mecanismo de acción de Bcl-2 involucra la regulación del movimiento de citocromo *c*, tal vez bloqueando los poros a través de los cuales éste se transporta (Yang y cols., 1997). Acorde a la estructura tridimensional determinada para la proteína homóloga Bcl-X_L, miembros de la familia de Bcl-2 tienen la capacidad de formar canales en las membranas, similares a los que forma la toxina de la difteria. Dichos canales pueden permitir el paso de iones o servir como transportadores de proteínas como pudiera ser el citocromo *c* (Muchmore y cols., 1996). Mediante análisis de predicción de estructura tridimencional, se ha postulado que las regiones hidrofóbicas que contienen los dominios BH1 y BH2 podrían formar poros en las membranas. De hecho, en ciertas circunstancias (en ocasiones, no fisiológicas) Bcl-X_L, Bcl-2 y Bax pueden formar canales en liposomas, aunque hay poca evidencia de que lo mismo suceda dentro de las células. La capacidad de formar poros por parte de Bax permite imaginarse que de esta forma daña a la mitocondria e induce la muerte celular, pero resulta difícil entender cómo Bcl-2 o Bcl-X_L protegen de muerte formando poros. Una visión alternativa podría ser que la familia de Bcl-2, más que formar poros nuevos, regula la función de canales preexistentes en la mitocondria, que permitan o no el paso de moléculas pequeñas. Tal canal parece ser el denominado "poro de permeabilidad transitoria" (*permeability transition pore*), que se piensa se

Miembros de la familia de Bcl-2 tienen la capacidad de formar canales en las membranas.

forma en los puntos de contacto de las membranas externa e interna de la mitocondria. Los componentes de este canal parecen ser el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana externa, el translocador del nucleótido adenina (ANT) en la membrana interna y la ciclofilina D (*cyclo D*) en la matriz. El canal abierto permite el paso de moléculas de 15 kDa o menores, y hay evidencia de que el paso por el poro se regula. La abertura del canal en la membrana interna disipa el gradiente de H^+ a través de la membrana, desacoplando la cadena respiratoria de la producción de ATP. Como resultado, se hincha la matriz y se presupone que esto provoca la ruptura de la membrana externa, permitiendo la salida de las moléculas proapoptóticas. Aún es controversial si miembros de la familia de Bcl-2 pueden regular este poro, aunque hay cierta evidencia de que Bcl-X_L y Bax interactúan con VDAC, Bcl-X_L cierra el canal, mientras que Bax y Bak lo mantienen abierto, permitiendo el paso del citocromo *c* (Shimizu y cols., 1999).

Aún se necesitan muchos estudios para determinar el mecanismo por el cual la familia de Bcl-2 regula la salida de las moléculas apoptogénicas de la mitocondria, pero un modelo especulativo es el siguiente: en células sanas, miembros antiapoptóticos se asocian directa o indirectamente con VDAC, estabilizando su conformación abierta. Cuando llega una señal de muerte, miembros de la subfamilia BH3 se translocan a la mitocondria e interactúan con miembros de la subfamilia Bcl-2, alterando la interacción con VDAC para favorecer su cerrado. Los consecuentes cambios iónicos y de pH podrían entonces provocar la translocación y oligomerización de miembros de la subfamilia Bax. Estos últimos, tal vez en interacción con VDAC, podrían crear nuevos canales, lo suficientemente grandes, para permitir la salida de proteínas como el citocromo *c* y Smac/diablo, las que dispararían la activación de la cascada de caspasas.

Proteínas diversas interactúan con la familia de Bcl-2

Hay otras proteínas que también interactúan con Bcl-2, que no tienen secuencias relacionadas a ella. Tal es el caso de Bag, una proteína que cuando se sobreexpresa protege de muerte y se une a Bcl-2. Dentro de su estructura, resulta interesante una región que presenta 66% de identidad con proteínas tipo ubiquitina, incluyendo la lisina a la que se une covalentemente otra ubiquitina, lo que sugiere que podría ser degradada por el proteosoma (Takayama y cols., 1995). Es posible imaginarse que la interacción con Bcl-2 la estabilice, lo cual a su vez permite especular que Bcl-2 podría funcionar estabilizando proteínas cuya función sea evitar la muerte. Una hipótesis más especulativa aún podría ser que la región homóloga a ubiquitina sirva para acercar al heterodímero Bag/Bcl-2 a un complejo de proteasas involucrado con la regulación de la muerte.

De las proteínas descritas que se asocian a Bcl-2, las más interesantes son R-Ras y Raf-1, ya que permiten establecer una conexión entre las señales extracelulares mediadas por factores de crecimiento o citocinas y la maquinaria de muerte. La interacción de R-Ras con Bcl-2 ocurre tanto *in vitro*

como *in vivo* (Fernandez-Sarabia y Bischoff, 1994), y se ha observado que la expresión de *R-Ras* antagoniza la capacidad de Bcl-2 de bloquear la apoptosis (Wang y cols., 1995).

Aunque aún no está claro el mecanismo de acción de Bcl-2, parece fundamental su interacción con Raf-1. Esta interacción es relevante para translocar a Raf-1 a la mitocondria, ya que si a Raf-1 se le añade una secuencia de señal de anclaje a la mitocondria, adquiere la capacidad de evitar la muerte en ausencia de Bcl-2, lo que no sucede si se le pone una señal de localización a la membrana plasmática o si se mantiene en el citoplasma. Por lo tanto, Raf-1 podría tener sustratos fosforilables localizados en la mitocondria, involucrados en el control de la MCP (Wang y cols., 1996).

Si a Raf-1 se le añade una secuencia de señal de anclaje a la mitocondria, adquiere la capacidad de evitar la muerte en ausencia de Bcl-2.

Miembros de la familia de Bcl-2 se modifican postraduccionalmente

La fosforilación es una de las principales modificaciones postraduccionales que regulan la actividad de las proteínas. En el caso particular de Bcl-2, aún es un poco controversial el efecto que tiene la fosforilación, pues tiene un efecto tanto en su activación (Chen y Faller, 1996) como en su inactivación (Haldar y cols., 1995). Sin embargo, estudios de mutagénesis, en los que se elimina la región fosforilable de Bcl-2, muestran que la fosforilación tiene un efecto inhibitorio, ya que su transfección en timocitos estimula la sobrevivencia celular, mientras que la proteína Bcl-2 silvestre no es capaz de hacerlo, pues se fosforila en el interior de la célula (Gajewski y Thompson, 1996).



Otros reguladores positivos y negativos de la MCP

El proteosoma participa en la regulación de la MCP

Existen dos mecanismos generales para la degradación de proteínas dentro de la célula eucarionte. El primero es el sistema lisosomal, que principalmente degrada las proteínas ingeridas por endocitosis mediada por receptor y por pinocitosis, por lo cual, difícilmente participaría en procesos regulatorios, ya sean citoplásmicos o nucleares. El segundo mecanismo es la proteólisis por un complejo multicatalítico, denominado proteosoma 26S, que requiere la ubiquitinación, proceso dependiente de ATP, de las proteínas intracelulares que digiere. La ubiquitinación consiste en la unión de la ubiquitina, un polipéptido de 76 aminoácidos, a una lisina preferencialmente dentro de la secuencia PEST. Esta reacción es mediada por tres enzimas: E1, que cataliza la activación de la ubiquitina, produciendo un intermediario de alta energía; E2, que transfiere la ubiquitina activada de E1 a la ubiquitina-proteína-ligasa E3; y la ligasa E3 que cataliza la formación de un enlace isopeptídico (enlace covalente entre el carboxilo-terminal de la glicina de la ubiquitina con el amino ε terminal de

la lisina) entre la ubiquitina y la proteína blanco. La lisina de la ubiquitina es a su vez ubiquitinilada, generando un complejo de ubiquitinas asociadas a la proteína. A pesar de que desde hace mucho tiempo se conoce que el proteosoma degrada las proteínas mal estructuradas o mutantes, también puede degradar proteínas en buen estado y participar en procesos regulatorios, como la presentación de antígenos, la progresión del ciclo celular, la regulación transcripcional y la oncogénesis (Pahl y Baeuerle, 1996). Recientemente se desarrollaron inhibidores específicos para el proteosoma que han permitido discernir el papel de este complejo en distintas funciones celulares, sin la interferencia de otras proteasas como la calpaína. Relevante al estudio de la MCP, es el descubrimiento de que la actividad del proteosoma es necesaria para la progresión de la apoptosis tanto en neuronas desprovistas de NGF (Sadoul y cols., 1996), como en timocitos inducidos a muerte por diversos estímulos, como la radiación y la presencia de glucocorticoides o ésteres de forbol (Grimm y cols., 1996). En ambos sistemas se observa que la presencia de inhibidores específicos del proteosoma, como la lactacistina, inhibe la activación de caspasas. Estos resultados permiten especular que el proteosoma podría participar en la regulación de la muerte, tal vez degradando a un inhibidor de la apoptosis como Bcl-2, o bien activando a caspasas mediante la degradación de un inhibidor, de manera análoga a la regulación descrita para NFkB (Nuñez y cols., 1991).

La actividad del proteosoma es necesaria para la progresión de la apoptosis.

Dad-1 es un grupo de proteínas que inhiben la apoptosis

El gen *dad*-1 es la causa génica de la inmortalización de una línea celular de hámster, que tiene una mutación termosensible que provoca la apoptosis cuando se cultiva a la temperatura restrictiva. La proteína Dad-1 es hidrofóbica y se expresa de manera ubicua. También se encuentra muy conservada en la evolución, ya que se han identificado homólogos en otros mamíferos (por ejemplo, humano), sapos, nemátodos e incluso plantas, con altos porcentajes de identidad (más de 90% entre vertebrados y de 60% en plantas). Además, son funcionalmente equivalentes, ya que la expresión de Dad-1 de humano en *C. elegans* previene la MCP con la misma eficiencia que el gen endógeno (*ce-dad-1*). Recíprocamente, el gen *ce-dad-1* rescata a la línea mutante de hámster de manera equivalente que los genes de vertebrados. El mecanismo bioquímico por el cual Dad-1 actúa es desconocido, pero, dado su carácter hidrofóbico, debe ejercer su efecto en un compartimento membranal. No parece tener un efecto en la expresión de *bcl-2* y más bien podría participar en un punto posterior en la cascada de muerte, ya que la sobreexpresión de *bcl-2* no rescata a la mutante termosensible de hámster. Puesto que todas las proteínas Dad-1 descritas tienen dos aspárticos conservados, se postula que Dad-1 podría ser sustrato de las caspasas y que, por ser un factor de sobrevivencia, su digestión desencadenaría la muerte celular (Sugimoto y cols., 1995).

Los virus contienen genes controladores de la apoptosis

Normalmente, las células del sistema inmune detectan y matan a células infectadas, de manera que resulta conveniente para la propagación de un virus no sólo promover la proliferación sino, además, bloquear la apoptosis. Además, proteger a la célula de entrar en apoptosis debe también ser un requisito por parte del virus, pues la activación de sus genes de proliferación también promueve la muerte celular (ver abajo). Entonces, no es de sorprender que algunos virus tengan en su genoma contrapartes de Bcl-2 que les permitan mantener vivas a las células, puesto que son las fábricas para producir su progenie. Tal es el caso de la proteína E1B de 19 kDa de adenovirus, cuya expresión se requiere para inhibir la apoptosis durante la infección viral; esta proteína es capaz de inhibir la muerte inducida por Tnfα y FasL, interactúa con Bak (Farrow y cols., 1995), y se ha observado que bloquea la activación de caspasa-3. Los virus llamados de Eipstein-Barr y el de la fiebre africana del cerdo (ASFV) tienen genes homólogos a *bcl-2*, denominados BHRF-1 y LMWS-HL, respectivamente. De éstos, se ha demostrado que BHRF-1 es capaz de prevenir la muerte (White 1993).

Los virus albergan otros tipos de proteínas que también tienen la capacidad de bloquear la muerte, como las proteínas de baculovirus IAP (mencionadas anteriormente) y p35. La proteína p35 es de particular relevancia, ya que es capaz de bloquear la muerte en mamíferos, insectos y nemátodos (por ejemplo, rescata las mutantes *ced-9* de *C. elegans* (Sugimoto y cols., 1994)), sugiriendo que las moléculas blanco con las que interactúa están conservadas evolutivamente. De hecho, actúa como un inhibidor competitivo de miembros de la familia de las caspasas, que, como se revisó anteriormente, efectivamente están conservadas evolutivamente. La proteína p35 se digiere por las caspasas en dos partes, una de las cuales se mantiene unida formando un complejo caspasa/p35 estable (Earshaw y cols., 1999; Bump y cols., 1995), y de esta manera evita que la caspasa pueda degradar otro sustrato.

El virus HIV que provoca el SIDA ha adquirido una estrategia única que, para multiplicarse, aprovecha la apoptosis. Induce la muerte de células T mediante una proteasa que digiere a Bcl-2 (descrita anteriormente), con lo cual provoca el engullimiento de cuerpos apoptóticos por parte de monocitos y macrófagos, los cuales se convierten en células infectadas crónicamente por el virus. Los monocitos y los macrófagos infectados sirven como reservorios y transportadores del HIV a órganos distantes del paciente (Butke y Sandstrom, 1994).



Señales que convergen en la maquinaria de muerte

Los factores de sobrevivencia usan vías de transducción comunes para evitar la MCP

La fase de activación de la MCP es un proceso que, en similitud con los mecanismos de activación de la diferenciación y la proliferación, es muy

variado y específico para cada tipo celular. Esto es evidente, no sólo por la carencia de mutantes en esta fase en *C. elegans* que afecten la muerte celular en general, sino por la variedad de factores descritos, principalmente en mamíferos, capaces de provocar o prevenir la MCP. Estos factores incluyen componentes de la matriz extracelular, contactos celulares y factores difusibles proteicos o no proteicos, cada uno de los cuales transduce señales al interior de la célula por rutas muy particulares mediadas por sus receptores. No obstante, independientemente de la diversidad de estos activadores (o inhibidores) y las señales intracelulares generadas, ellos tienen que actuar ya sea sobre la maquinaria ejecutora del proceso apoptótico como tal o sobre sus reguladores directos. Así, entonces, con base en lo descrito en las secciones anteriores, es factible que las señales de activación recaigan en caspasas, componente fundamental de la maquinaria ejecutora, o en miembros de la familia de Bcl-2, reguladores predominantes de la maquinaria de muerte. La mayor parte de la información sobre las vías de activación de la maquinaria de muerte, así como del posible mecanismo bioquímico por el cual actúa, se ha obtenido con modelos basados en células del adulto, principalmente del sistema inmune; por lo tanto, la mayor parte de la información que se expone a continuación no necesariamente ocurre también durante el desarrollo.

Muchos factores de sobrevivencia activan receptores que tienen actividad de tirosincinasa.

Muchos factores de sobrevivencia activan receptores que tienen actividad de tirosincinasa, los cuales inician una cascada de transducción de la señal que involucra fosforilaciones sucesivas. En esta cascada (Grb2-Sos-Ras-Raf-Mapk), por lo menos dos elementos actúan, como se esperaría, de manera protectora: Raf-1 que interactúa directamente con Bcl-2, como se mencionó anteriormente, y H-Ras cuya versión oncogénica protege de muerte. Alternativamente a esta vía, se ha demostrado que el receptor de Igf-1, con actividad de tirosincinasa, transduce su señal de sobrevivencia a través de una cascada que involucra a la cinasa que fosforila los fosfoinosítidos en la posición 3 (PI3K) y a la cinasa denominada Akt; la expresión de Akt exógena incrementa la sobrevivencia, mientras que la presencia de una mutante dominante negativa (que no tiene actividad de cinasa) inhibe la sobrevivencia promovida por Igf-1 (Dudek y cols., 1997).

Otros factores que inciden sobre la apoptosis transducen señales por otras rutas que involucran, por ejemplo, segundos mensajeros clásicos como calcio, IP3 (inositol trifosfato) y AMPc (AMP cíclico) o cinasas multifuncionales como la Pkc. Los ésteres de forbol, por otro lado, que participan en la activación de la Pkc, han demostrado tener un efecto protector sobre la muerte, lo cual hace congruente que la Pkcδ sea un sustrato de las caspasas (Obeid y Hannun, 1995). Globalmente, rutas de transducción en respuesta a señales extracelulares que recaen en la activación de los elementos básicos del complejo transcripcional AP-1 (constituido por Fos y Jun), terceros mensajeros comunes dentro de la rutas de transducción que utilizan ésteres de forbol o calcio, pudieran ser utilizadas para la activación de la apoptosis, ya que la transcripción de estos factores se eleva frecuentemente durante la muerte, pero también pudieran representar un indicio de intentos de la célula para defenderse de promotores de muerte. Sin embargo, datos recientes involucran claramente a c-Jun como un promotor de apoptosis tanto *in vitro* como *in vivo*.

El efecto de TNFα sobre una célula es muy interesante, pues genera en el interior un equilibrio entre la vida y la muerte. TNFα induce la activación de un factor de transcripción denominado factor nuclear kappa B (NF-κB), el cual activa la transcripción de genes involucrados en la respuesta a la inflamación, la infección y el estrés. La aparición de este factor de transcripción en respuesta a TNFα lo propuso como un mediador de la muerte, pero el ratón mutante deficiente de NF-κB muere antes del nacimiento, al parecer debido a una muerte masiva de células del hígado, lo cual implica que NF-κB induce la síntesis de proteínas que protegen a las células del hígado embrionario de morir. Además, si se impide la activación de NF-κB en diferentes tipos celulares (fibroblastos y macrófagos tumorales y no tumorales), las células se vuelven sensibles a morir ante el TNFα. Por lo tanto, NF-κB puede funcionar como un bloqueador general de la apoptosis, estableciendo una retroalimentación negativa con la vía apoptótica encendida por TNFα. Puesto que NF-κB se activa también en respuesta a diferentes agentes apoptóticos, como las drogas que se utilizan en la quimioterapia contra el cáncer, la ineficiencia en la respuesta al tratamiento puede deberse a la protección de la muerte mediada por NF-κB; por lo tanto, se podría mejorar el tratamiento incluyendo agentes que bloqueen a NF-κB (Beg y Baltimore, 1996).

La ceramida participa como segundo mensajero durante la cascada de muerte

La ceramida es un segundo mensajero común en muchas respuestas celulares que incluyen la diferenciación, la proliferación y la muerte celular. La relevancia de la ceramida en la MCP se demuestra al administrar a cultivos celulares variantes activas de la ceramida permeables a las células, las cuales inducen los cambios típicos de apoptosis como la fragmentación nuclear y la degradación internucleosomal del DNA; la utilización de análogos inactivos u otros lípidos que funcionan como segundos mensajeros (por ejemplo, diacilglicerol, ácido fosfatídico o ácido araquidónico) no inducen la muerte (Evan y cols., 1992). Es posible que el DM esté involucrado en la generación de ceramida, puesto que es un mensajero secundario común en la activación de la muerte por TNFR-1, Fas/Apo y RPR, aunque la ceramida es también generada durante la apoptosis inducida por radiación.

> La ceramida es un segundo mensajero común en muchas respuestas celulares que incluyen la diferenciación, la proliferación y la muerte celular.

La producción de ceramida se lleva a cabo a partir de la hidrólisis de la esfingomielina, un fosfolípido preferentemente concentrado en la membrana plasmática, catalizada por las esfingomielinasas segundos o minutos después de la estimulación ante distintas señales externas. La posterior regeneración de la esfingomielina se realiza al transferir el grupo colina de la fosfatidilcolina a la propia ceramida, completando así el ciclo de la esfingomielina. De aquí se desprende que, para generar ceramida, las señales inductoras de apoptosis deben estimular la activación de las esfingomielinasas. Hay dos formas de esfingomielinasa, distinguibles por el pH óptimo al cual actúan; una es ácida y se encuentra tanto en lisosomas como en la membrana plasmática, mientras que la otra es neutra, dependiente de mag-

nesio y se encuentra en el citoplasma y en la capa externa de la membrana plasmática. Aunque ambas enzimas son activadas por TNFα y FasL, sólo la esfingomielinasa ácida participa en la activación de la apoptosis, ya que células de ratones mutantes nulos en ésta, pero que producen cantidades normales de la forma neutra, ya no mueren por apoptosis inducida por radiación. Sin embargo, puesto que los ratones mutantes se desarrollan y nacen normalmente, la activación de la muerte durante el desarrollo parece no ser únicamente mediada por esta vía de señalización (Santana y cols., 1996).

La ceramida pudiera transducir la señal a la maquinaria de muerte, a través de enzimas que son activadas por este lípido, como la proteína serín (treonín)-cinasa membranal (llamada Capk) y la fosfoproteína fosfatasa citosólica (conocida como Capp). La primera es capaz de fosforilar a Raf-1, lo cual implica una conexión con la cascada de fosforilación regulada por receptores con actividad de tirosincinasas, mientras que de la segunda se desconocen sus sustratos. De acuerdo a su papel en la MCP, la actividad de Capk se estimula, y la proteína Capp se transloca a la membrana plasmática, en respuesta a TNFα. Capp pudiera ser más significativa en el proceso de MCP, ya que la apoptosis inducida por ceramida se bloquea en presencia de ácido okadaico, un inhibidor muy potente de esta enzima (Evan y cols., 1992). Por otro lado, es importante tomar en cuenta que, ya que la ceramida es capaz de generar estrés oxidativo, este mecanismo podría también participar durante la activación de la muerte (ver siguiente sección).

Independientemente del mecanismo que utilice la ceramida para activar la maquinaria de muerte, parece tener un papel dual, uno antes y otro después de las caspasas, estableciendo un ciclo retroalimentador con estas enzimas, en lugar de actuar simplemente en forma secuencial. Al analizar la muerte inducida por RPR en células de insecto, la generación de ceramida se evita en presencia de un inhibidor de estas proteasas, mientras que la muerte inducida por la adición directa de ceramida al cultivo no es evitable por el mismo inhibidor (Pronk y cols., 1996). Ya que se ha demostrado que la ceramida activa a las caspasas, específicamente Cpp32/Yama, es posible que la acción de las caspasas, a su vez, estimule la generación de ceramida (Martin y cols., 1995).

El estrés oxidativo actúa como un activador de la muerte celular

El estrés oxidativo se define como el estado en el cual los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) son superiores a la capacidad reductora de la célula. El oxígeno molecular acepta electrones fácilmente de otras moléculas para formar las ERO y es esta peculiaridad la que lo hace tóxico a las células. Por ejemplo, muchas reacciones intracelulares, entre ellas la respiración, reducen el oxígeno molecular a superóxido (O_2^-) o bien a peróxido de hidrógeno (H_2O_2); estas moléculas son moderadamente reactivas con las moléculas biológicas, pero el peróxido es muy reactivo en presencia de metales como el hierro y el cobre (reacción de Fenton), generando el radical

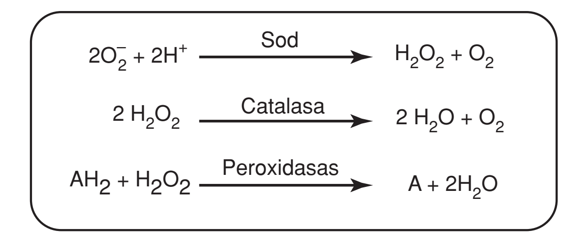


Figura 20-7. Reacciones catalizadas por enzimas antioxidantes para desintoxicar a las células de superóxido y peróxido de hidrógeno (AH_2, reductor).

hidroxilo (^-OH), el cual es altamente reactivo y tal vez directamente responsable de la mayor parte del daño oxidativo provocado por ERO observado en los sistemas biológicos. Por lo tanto, es importante que la célula elimine tanto al superóxido como al peróxido de hidrógeno, para lo cual cuenta con varios mecanismos. Uno de ellos es la superóxido-dismutasa (Sod), enzima que dismuta el superóxido para generar peróxido de hidrógeno, el cual, a su vez, es convertido en agua y oxígeno molecular por la catalasa; las peroxidasas catalizan una reacción análoga, en la cual el peróxido de hidrógeno es reducido a agua por un reductor (figura 20-7).

Es posible que el estrés oxidativo forme parte importante del proceso de muerte, pues muchos agentes que inducen apoptosis son oxidantes o bien estimulan el metabolismo oxidativo celular; además, en diversos sistemas, la muerte no sólo se asocia a un incremento en los niveles de ERO, sino que en ocasiones se evita por la presencia de antioxidantes endógenos o exógenos (Buttke y Sandstrom, 1994). Por ejemplo, el TNFα provoca un rápido incremento en ERO, y tanto este incremento como la muerte celular (Wong y cols., 1989) se pueden inhibir por la tiorredoxina, un tiol intracelular que actúa como antioxidante y pepenador de radicales libres (Matsuda y cols., 1991), por la *N*-acetilcisteína (NAC), un tiol antioxidante y precursor de glutatión reducido (GSH) (Chang y cols., 1992), o por la sobreexpresión de la *Sod-2* mitocondrial (Wong y cols., 1989).

Bcl-2 pudiera participar en el control de los niveles de ERO, puesto que su localización se correlaciona con sitios de producción de ERO, a saber, las membranas de la mitocondria, retículo endoplásmico y núcleo. Las propiedades antioxidantes de Bcl-2 pueden fundamentarse en la capacidad de esta proteína para inhibir la muerte producida en condiciones donde se genera estrés oxidativo como las radiaciones y el estrés calórico (Roffler-Tarlov y cols., 1996). Más específicamente, un aumento en la síntesis de Bcl-2 intracelular bloquea el incremento de ERO asociado a la muerte; por ejemplo, la presencia de Bcl-2 evita la peroxidación de lípidos durante la muerte inducida por dexametasona (Hockenberry y cols., 1993), así como el aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno y peroxidación de lípidos provocado al remover el GSH intracelular en un cultivo de neuronas (Kane y cols., 1993). Es también congruente con la actividad antioxidante, el hecho de que los ratones mutantes nulos en *bcl-2* se vuelven grises con el segundo ciclo del folículo piloso, indicando una falla en la regulación redox de la síntesis de melanina (Wang y cols., 1995).

Alternativamente se ha propuesto que Bcl-2 podría actuar como un prooxidante que, al incrementar la concentración de ERO de una manera controlada, provocaría la activación de enzimas antioxidantes. Esta hipótesis está basada en evidencias que muestran que, en bacterias, la expresión de *bcl-2* humano tiene un efecto inmediato prooxidante, que como consecuencia activa el mecanismo bacteriano de defensa al estrés oxidativo, como la expresión *KatG* que codifica para la catalasa, lo cual le confiere una resistencia 100 veces mayor al peróxido de hidrógeno. En concordancia, en una línea de células B la expresión de *Sod* está asociada a la presencia de Bcl-2 (Steinman, 1995).

El estrés oxidativo no forma parte esencial de la maquinaria de muerte.

No obstante lo anterior, el estrés oxidativo no forma parte esencial de la maquinaria de muerte, ya que la apoptosis se lleva a cabo en condiciones anaerobias, donde la producción de ERO es mínima (Jacobson y Raff, 1995). Además, puesto que la muerte inducida por hipoxia también tiene características apoptóticas y es protegida por Bcl-2 y Bcl-X_L, el mecanismo de inhibición de la muerte de estas proteínas no se limita a activar una vía antioxidante (Shimizu y cols., 1995). Por lo tanto, si dividimos el proceso de muerte en dos partes, la de activación y la de ejecución, lo más probable es que el estrés oxidativo participe en la fase de activación de la maquinaria de muerte, en lugar de formar parte del mecanismo que la ejecuta.

Debido a que las ERO son moléculas reactivas y, en general, no específicas, es difícil ensamblarlas dentro de cascadas de transducción de señales, funcionando como segundos mensajeros. Sin embargo, debido a que se puede modificar la actividad de algunas proteínas alterando su estado oxidado o reducido, pudiera ser que ciertos blancos de las ERO sean parte importante de cascadas de transducción. Por ejemplo, la actividad de algunos factores de transcripción se regula por redox tanto a nivel de su transcripción, incrementado la cantidad del factor, como postraduccionalmente, modificando su capacidad para unirse al DNA. En específico, la activación de NF-κB depende de la presencia de peróxido de hidrógeno (Schmidt y cols., 1995), mientras que para la inducción de la expresión de *c-Fos* en respuesta a TNFα y bFGF se requiere de la producción de ERO (Lo y Cruz, 1995). Además, la afinidad del complejo AP-1 por su sitio de reconocimiento en el DNA también se regula por el estado redox: en su estado oxidado, la capacidad de unión disminuye de manera significativa. Este último proceso es modulado por la proteína Ref-1 (*redox factor* 1), cuya actividad a su vez se regula de acuerdo a su estado oxidado o reducido, lo que está de acuerdo con la existencia de cascadas redox de regulación, de forma análoga a la regulación por cascadas de fosforilación-desfosforilación (Sun y Oberley, 1996).

La posibilidad de que el estrés oxidativo participe en vías de transducción de señales aumenta con el descubrimiento de que las proteínas reguladas por ERO no se restringen a factores de transcripción, sino que hay ejemplos de regulación por redox de la cinasa MAP (Fialkow y cols., 1994), así como de proteínas asociadas a membrana como RAS o los receptores de glutamato tipo NMDA (Lei y cols., 1992). Además, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que estimula la proliferación de células vasculares de músculo liso, provoca en minutos un aumento de

peróxido de hidrógeno. Si este aumento se impide por medio de la adición de catalasa o NAC, se bloquea por completo la estimulación de las células. Puesto que la respuesta a PDGF incluye fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, la activación de la cinasa MAP y síntesis de DNA, el hecho de que la simple abolición del incremento de peróxido de hidrógeno evite la estimulación de las células sugiere que éste puede actuar como una molécula transductora de señal fundamental (Sundaresan y cols., 1995).

Por lo tanto, no es de sorprender que el estrés oxidativo pueda ser parte de la cascada de trasducción de señales que activa la muerte. De hecho, tal parece ser el caso en la muerte de neuronas simpáticas provocada por la ausencia de NGF. En este sistema ocurre un aumento transitorio de ERO antes de que aparezcan los cambios morfológicos típicos de apoptosis, y dicha muerte se evita por la presencia de Sod sólo cuando se aplica en una etapa temprana (es decir, anterior al pico de las ERO) (Greenlund y cols., 1995).

Es posible que el estrés oxidativo también medie la muerte celular durante el desarrollo. En el blastocisto de ratón, células con el potencial de formar el trofectodermo, que son las que formarán las estructuras extraembrionarias como la placenta, se mueren en el blastocelo (es decir, cavidad del blastocisto), mediante un mecanismo que involucra al peróxido de hidrógeno, mientras que las células capaces de formar parte de la masa celular interna, que son las que darán lugar al embrión como tal, no se mueren (el peróxido de hidrógeno parece originarse a partir de la oxidación de poliaminas). Esta MCP pudiera tener como finalidad evitar la "contaminación" del embrión con células con potencial extraembrionario. (Es posible que la inducción de estrés oxidativo a partir de la peroxidación de poliaminas sea un mecanismo común para inducir la MCP en varios momentos del desarrollo, pues también se ha observado actividad de poliaminoxidasas en otras regiones de muerte, como la región interdigital de los miembros (Parchment, 1993).) Además, utilizando reactivos fluorescentes que detectan ERO (dicloro-dihidro-fluoresceína) y apoptosis (anaranjado de acridina), se ha observado que en diferentes regiones del embrión del ratón donde ocurre MCP, como los interdígitos, el esternón, el paladar, etc., también hay estrés oxidativo. Usando un sistema de cultivo *in vitro* de miembros de embrión de ratón, donde el proceso de desarrollo ocurre de forma normal, se disminuye la MCP en los interdígitos en presencia de antioxidantes.

En plantas, las ERO están implicadas en la llamada respuesta hipersensitiva de resistencia a patógenos, en la cual ocurre muerte de las células que rodean el sitio de infección, delimitando la zona de propagación del patógeno. En una mutante de *Arabidopsis thaliana*, hay un descontrol de la muerte celular en ausencia del patógeno y no se detiene la expansión de la muerte una vez que se inició. El superóxido es necesario y suficiente para iniciar la formación de la lesión y se acumula justo antes del inicio de la muerte celular (Jabs y cols., 1996). Esto refleja que las plantas comparten al menos parte del proceso de muerte que sucede en células animales.

Los movimientos de calcio intracelular ocurren durante la activación de la muerte celular

El calcio es un mensajero fundamental en muchos procesos celulares; multitud de enzimas son sensibles a este ion, y es quizá éste el mecanismo usado más ampliamente para desencadenar respuestas celulares específicas. La importancia del calcio en la MCP se ha derivado de estudios que involucran drogas que bloquean o estimulan la movilización de calcio intracelular. La tapsigargina, que bloquea la ATPasa dependiente de Ca^{+2} del RE encargada de disminuir el Ca^{+2} citoplásmico y retomarlo hacia las pozas intracelulares en el RE, e ionóforos de Ca^{+2} que facilitan la entrada de Ca^{+2} a través de la membrana plasmática, inducen la apoptosis en muchos tipos celulares. La muerte también se dispara en timocitos por la estimulación del receptor de células T, y en neuronas por la estimulación con glutamato de receptores tipo NMDA, y ambas respuestas involucran un incremento de Ca^{+2} sostenido (McConkey y Orrenius, 1994). Es posible que la salida de calcio del RE sea relevante en el proceso de muerte, pues durante la apoptosis provocada por el tratamiento con glucocorticoides, la sobreexpresión de una proteína que une calcio en el RE (calbindina), retarda la apoptosis (Hanada y cols., 1995). En concordancia, uno de los receptores conocidos a IP3 se requiere para que ocurra la MCP de linfocitos causada por dexametasona (Khan y cols., 1996). Además, durante la apoptosis inducida por ausencia del factor de sobrevivencia IL3, ocurre un movimiento gradual de calcio, en el que disminuye la concentración en el RE y aumenta en la mitocondria; la presencia de Bcl-2 evita tanto el movimiento de calcio como la muerte, lo cual sugiere que Bcl-2 podría también participar en la distribución del calcio intracelular. Consistentemente, Bcl-2 se localiza en los principales sitios de almacenamiento de calcio, como son el espacio entre las membranas interna y externa del núcleo, así como su continuidad con el lumen del retículo endoplásmico. No obstante lo anterior, aún no se ha determinado cómo el movimiento de Ca^{+2} incide sobre la maquinaria de muerte, pero las endonucleasas que digieren el DNA de manera internucleosomal, las cuales requieren Ca^{+2} para ser activadas, podrían ser parte de los blancos de este ion. Por otro lado, es interesante mencionar que agentes prooxidantes inducen movilidad de calcio intracelular (Richter, 1993), lo que es consistente con la demostración de que la muerte causada por incremento en peróxido en plantas requiere de un incremento en el calcio intracelular (Levine y cols., 1996).

> Es posible que la salida de calcio del RE sea relevante en el proceso de muerte.



La apoptosis y el ciclo celular

Moléculas inductoras de la proliferación celular también inducen apoptosis

Diferentes líneas de razonamiento han generado la noción de que hay una conexión entre la apoptosis y el ciclo celular. Algunos cambios morfológicos observados durante la apoptosis que son reminiscentes de los que

ocurren durante la mitosis, como la pérdida de adherencia por la célula, la condensación de la cromatina y la fosforilación y desensamblaje de las láminas del núcleo, son sugestivos del uso y control de una maquinaria molecular compartida. Más revelador aún es la capacidad de distintos oncogenes, que generan proliferación descontrolada, de inducir apoptosis. Un caso típico es el efecto provocado por la proteína E1A de adenovirus, la cual, además de ser la principal proteína del virus promotora de la proliferación celular, simultáneamente induce la apoptosis, por lo que, para la propagación exitosa del virus, es necesaria la presencia de E1B de 19 kDa (referida anteriormente), capaz de bloquear la muerte inducida por E1A. Las regiones de la proteína E1A necesarias para inducir la proliferación (por ejemplo, los dominios que median la interacción con la proteína de retinoblastoma, pRB) son las mismas que se requieren para la promoción de la apoptosis, sugiriendo que los mismos blancos están involucrados en ambos procesos (Evan y cols., 1995).

Las proteínas E7 del papilomavirus, el antígeno T grande (AgT) del virus SV40 y *c-myc*, presentan la misma función dual de E1A, pues todos son potentes inductores tanto de la proliferación como de la apoptosis. Por ejemplo, cuando se activa *c-myc* en fibroblastos cultivados en suero, el número total de células no aumenta porque hay una muerte sustancial por apoptosis. Las regiones de *c-myc* necesarias para provocar la apoptosis son las mismas que se requieren para la transformación, autorregulación e inhibición de la diferenciación, como el dominio que permite la heterodimerización con Max (Amati y cols., 1993). Por tanto, el mecanismo molecular por el cual *c-myc* induce la apoptosis está relacionado con el mecanismo molecular por el cual realiza otras funciones (Evan y cols., 1992).

> Las regiones de *c-myc* necesarias para provocar la apoptosis son las mismas que se requieren para la transformación.

La inducción de la apoptosis por *c-myc* se ha observado también en animales completos. Animales transgénicos cuyos linfocitos expresan *c-myc* constitutivo presentan elevados niveles de apoptosis espontánea y una mayor sensibilidad para la inducción de la muerte en órganos linfoides. Consistente con la capacidad de *c-myc* para activar la MCP, Bcl-2 inhibe la muerte inducida por *c-myc*, y la presencia de ambas proteínas sinergizan la oncogenicidad en ratones transgénicos, indicando que la muerte celular es un importante constreñimiento durante la carcinogénesis inducida por *c-myc* en ausencia de Bcl-2.

La inducción de la muerte celular se asocia a cambios en reguladores del ciclo celular

De acuerdo con los efectos de los oncogenes mencionados en la sección anterior, durante la muerte provocada a células en estado quiescente de la próstata por remoción de factores de sobrevivencia, hay incorporación de bromodeoxiuridina, indicando que las células iniciaron la síntesis de DNA y, asociado a este proceso, se activa la expresión de *c-myc* y *c-fos* (Colombel y cols., 1992). De manera similar, durante la MCP de neuronas posmitóticas desprovistas de NGF hay una activación selectiva de ciclina D1, que promueve la entrada a la fase S (Freeman y cols., 1994). La

ciclina A podría tener una participación más directa en la muerte, ya que se activa en la apoptosis inducida por *c-myc*, y su expresión resulta suficiente para inducir la MCP (Hoang y cols., 1994).

También reguladores mitóticos parecen participar en la activación de la muerte, pues la activación de la cinasa $p34^{cdc2}$ en tiempos inapropiados durante el ciclo celular provoca muerte con características apoptóticas. En concordancia, la muerte de diferentes tipos celulares inducida por células T citotóxicas o por granzima B/fragmentina 2 requiere de la activación prematura de $p34^{cdc2}$, ya que la fragmentación del DNA y del núcleo no suceden si ésta se inactiva (Shi y cols., 1994). En la apoptosis inducida por agentes genotóxicos están implicadas también ciclinas y CDK (cinasas dependientes de ciclina) mitóticas; por ejemplo, en células HeLa tratadas con estaurosporina, cafeína, 6-dimetilaminopurina o ácido okadaico provocan la elevación de ciclina A, además de las cinasas $p34^{cdc2}$ y $p34^{cdk2}$, y en células HL60 tratadas con campotecina, un inhibidor de la topoisomerasa I, se activan ciclina B1 y $p34^{cdc2}$. Sin embargo, la activación de $p34^{cdc2}$ no es un requerimiento universal, pues no se activa durante la muerte inducida por falta de factores de sobreviviencia en fibroblastos y neuronas, e incluso hay casos en los que su activación está asociada a la protección de la muerte.

Por lo tanto, la activación de múltiples moléculas reguladoras del ciclo celular durante la MCP apoya la interacción entre el proceso que controla la MCP y el que controla la proliferación. No obstante las correlaciones mencionadas, su relevancia no siempre ha sido demostrada; por ejemplo, la participación de c-Fos en la promoción de la MCP no está muy clara, pues aun cuando se detecta su activación en las células que van a morir por apoptosis en gran variedad de regiones del embrión y durante la muerte inducida por diversos estímulos (Smeyne y cols., 1993), ratones mutantes nulos en c-fos presentan un patrón normal de MCP (Roffler-Tarlov y cols., 1996). Considerando que los partícipes en la división celular como *c-myc* y $p34^{cdc2}$ inducen apoptosis cuando son activados en condiciones no proliferativas (por ejemplo, en ausencia de suero), se ha planteado la hipótesis en la que la muerte se activa a partir de un conflicto de señales: la célula recibe instrucciones intracelulares para proliferar en un contexto no proliferativo. Sin embargo, dos hipótesis alternativas son plausibles: en una, algunas moléculas que regulan el ciclo celular tendrían un papel dual que interactúan con distintos blancos, dependiendo del proceso donde participen, y en otra, la ocurrencia de la MCP depende de la activación de la maquinaria del ciclo celular en, por ejemplo, condiciones no proliferativas.

La proteína supresora de tumores pRb participa en el control de la MCP

Muchas proteínas oncogénicas virales, como E1A, E7 y AgT, se unen a pRb hipofosforilado (pRb-hipo) e inhiben su actividad antiproliferativa mediada por el secuestro del factor transcripcional E2F, regulador positivo de la expresión génica de la fase S del ciclo celular; es decir, la unión de los on-

cogenes liberan a E2F de tal forma que se promueve el progreso del ciclo celular cuando pRb está hipofosforilado, como en la fase G0. Así, entonces, el mecanismo anterior es el responsable de los efectos proliferativos de algunos oncogenes y pudiera ser el medio para activar la MCP en ciertas condiciones. Consistente con esta idea, la sobreexpresión de *e2f* genera el mismo fenotipo que la presencia de E1A, es decir, la inducción tanto de proliferación como de apoptosis. En consecuencia, la presencia de pRb activa (es decir, pRb-hipo) debería tener un papel protector de la muerte. En efecto, la sobreexpresión de *rb* en células de la línea P19 derivada de carcinoma embrionario y la línea SAOS-2 derivada de osteosarcoma, evita la MCP causada por la aplicación de ácido retinoico y por irradiación, respectivamente. Además, el ratón con una mutación nula en *rb* muere a los 12 a 13 días *post coitum* y presenta, además de proliferación inapropiada, muerte masiva principalmente en el hígado, en células hematopoyéticas derivadas del hígado, y en el sistema nervioso tanto periférico como central, que son los tejidos donde normalmente se expresa *rb* de manera abundante (Clarke y cols., 1992).

Lo anterior es consistente con la hipótesis de que pRb-hipo protege de muerte al promover un estado quiescente en el cual las células son menos susceptibles a la apoptosis. Sin embargo, la simple detención del ciclo celular mediante la adición de afidocolina, un inhibidor específico de la DNA-polimerasa α, no protege a las células SAOS-2 de morir por apoptosis inducida por irradiación (Haas-Kogan y cols., 1995); por lo tanto, pRb participa en la prevención de la apoptosis por un mecanismo que difiere del de sólo evitar la replicación del DNA. Tal vez sea importante su interacción con otros reguladores del ciclo celular como E2F, ciclina D, o *myc*, o bien el estado de frenado en G1/G0 no es competente para que la MCP ocurra. La relevancia de pRb en la MCP se acentúa con las evidencias que muestran un corte de esta proteína por una caspasa durante la progresión de la apoptosis inducida por estaurosporina o por TNFα. Aunque aún no está clara la consecuencia de dicho procesamiento, es posible que parte del proceso de muerte involucre la supresión de la actividad protectora de pRb-hipo (Janicke y cols., 1996).

La pRb-hipo protege de muerte al promover un estado quiescente en el cual las células son menos susceptibles a la apoptosis.

La proteína supresora de tumores p53 se requiere para que la MCP ocurra en algunos sistemas

La p53 es uno de los primeros supresores tumorales identificados cuyo gen se encuentra mutado en un porcentaje muy alto de los tumores humanos (70%). De acuerdo con su papel en carcinogénesis, ratones con una mutación nula en *p53* se desarrollan normalmente, pero tienen una alta incidencia de tumores en la edad adulta. Cuando el DNA sufre daño, ya sea por radiaciones o por agentes químicos, *p53* se activa y provoca que el ciclo celular se detenga, dándole tiempo para que la maquinaria de reparación del DNA actúe, razón por la que se le ha denominado el guardián del genoma. Sin embargo, cuando el daño al DNA es importante y rebasa la capacidad de reparación, la célula se muere por apoptosis por un mecanismo que

La muerte causada por la activación inapropiada del ciclo celular, como la inducida por *c-myc*, E1A y E2F, requiere de p53.

requiere de p53. La muerte causada por la activación inapropiada del ciclo celular, como la inducida por *c-myc*, E1A y E2F, requiere de p53 (Bates y Vousden, 1996). En relación a lo anterior, es interesante que la muerte observada en el sistema nervioso en desarrollo de un embrión con mutaciones nulas en ambos alelos de *Rb* ($Rb^{-/-}$) se evita cuando *p53* está ausente (es decir, en un embrión $Rb^{-/-}; p53^{-/-}$). Entonces, aunque *p53* no parece tener una función durante el desarrollo, éste se puede activar en respuesta a una desregulación del ciclo celular, promoviendo la apoptosis (Macleod y cols., 1996).

Ratones $p53^{-/-}$ y con uno de los alelos de *Rb* funcional ($Rb^{-/+}$) han sido muy útiles para demostrar la importancia de la muerte celular mediada por p53 para evitar la formación de tumores. En ratones $Rb^{-/+}$ se generan lesiones degenerativas asociadas a mutaciones somáticas en el segundo alelo de *Rb,* pero en ausencia de *p53*, surgen tumores que crecen agresivamente. Por lo tanto, el crecimiento continuo de células que perdieron el punto de control determinado por pRb parece depender de la pérdida de la respuesta apoptótica mediada por p53, lo cual explica por qué ambas proteínas son un blanco simultáneo en muchos ejemplos de progresión maligna.

Aunque aún no está claro si la detención del ciclo celular y la inducción de la apoptosis son manifestaciones de la misma actividad de p53, parece que dependen en parte de dominios diferentes de la proteína. Para detener la progresión del ciclo celular, p53 activa la transcripción de algunos genes como *p21 CIP1/WAF1,* un inhibidor de las CDK que promueven la progresión del ciclo celular mediante la fosforilación (y a su vez inactivación) de pRb. Esta actividad pudiera participar en el control de la expresión de *bax* puesto que su región promotora tiene secuencias de unión a p53 y se ha demostrado que puede ser transactivado por p53 (Miyashita y Reed, 1995), si bien esto puede ser mediado o en cooperación con otros miembros de la familia de p53 como p63 o p73. La importancia de este mecanismo se ha determinado *in vivo* en modelos de oncogénesis, pues la ausencia de *bax* incrementa la formación de tumores, aun en presencia de p53 (Yin y cols., 1997). Sin embargo, ésta no puede ser la única ruta de activación de la maquinaria de muerte por p53, ya que, por un lado, no siempre se ha observado que incrementen los niveles del mRNA o de la proteína de *Bax* durante la muerte mediada por p53 y, por otro, las células de ratones mutantes nulos en *bax* expuestas a irradiación, mueren por apoptosis dependiente de p53 (Pahl y Baeuerle, 1996). En apoyo a lo anterior se ha observado que la apoptosis inducida por daño al DNA dependiente de p53 se lleva a cabo en ausencia de síntesis de RNA o proteína (Caelles y cols., 1994).

Alternativamente, la actividad de represión transcripcional de p53 pudiera ser más significativa en el mecanismo de inducción de apoptosis mediado por esta proteína, pues entre los genes reprimidos por p53 está *bcl-2*. De acuerdo con este mecanismo, tanto en células de cáncer mamario (Haldar y cols.,1994) como en células de leucemia murina se ha observado que la sobreexpresión de p53 reduce la cantidad de mRNA y de proteína de Bcl-2 y, además, ratones deficientes en p53 presentan mayor cantidad

de Bcl-2 y menor cantidad de Bax en diferentes tejidos (Miyayashita y cols., 1994). Las proteínas Bcl-2 y E1B, por otro lado, tiene efectos negativos sobre la actividad represora de p53 ya que su sobreexpresión bloquea esta actividad y consecuentemente aumentan la expresión de los genes reprimidos por p53 (Shen y Shenk, 1994).

Al momento, no hay un consenso sobre el mecanismo por el cual p53 induce apoptosis o detención del ciclo celular. Se han postulado dos modelos (figura 20-8) para explicar el mecanismo por el cual p53 media la apoptosis y su relación con su actividad antiproliferativa. En el primer modelo existe un conflicto de señales, donde la apoptosis es el resultado directo de la implementación del punto de control en G1 por parte de p53 en una célula que simultáneamente está recibiendo una señal proliferativa; tal podría ser el caso de la muerte inducida por proteínas como E1A, c-Myc o E2F, y concordaría con la protección mediada por pRb-hipo. En el segundo modelo, la detención del ciclo celular y la inducción de la apoptosis serían procesos independientes y separables. Este modelo se apoya en los resultados que indican que la pérdida de una vía no necesariamente perturba a la otra; una mutación puntual de p53 que retiene la capacidad de activar a p21CIP1/WAF1 e induce detención del ciclo celular, es incapaz de activar la apoptosis (Rowan y cols., 1996). Con base en lo descrito anteriormente, es probable que ambos operen, dependiendo del tipo celular y de las circunstancias de la célula en cuestión.

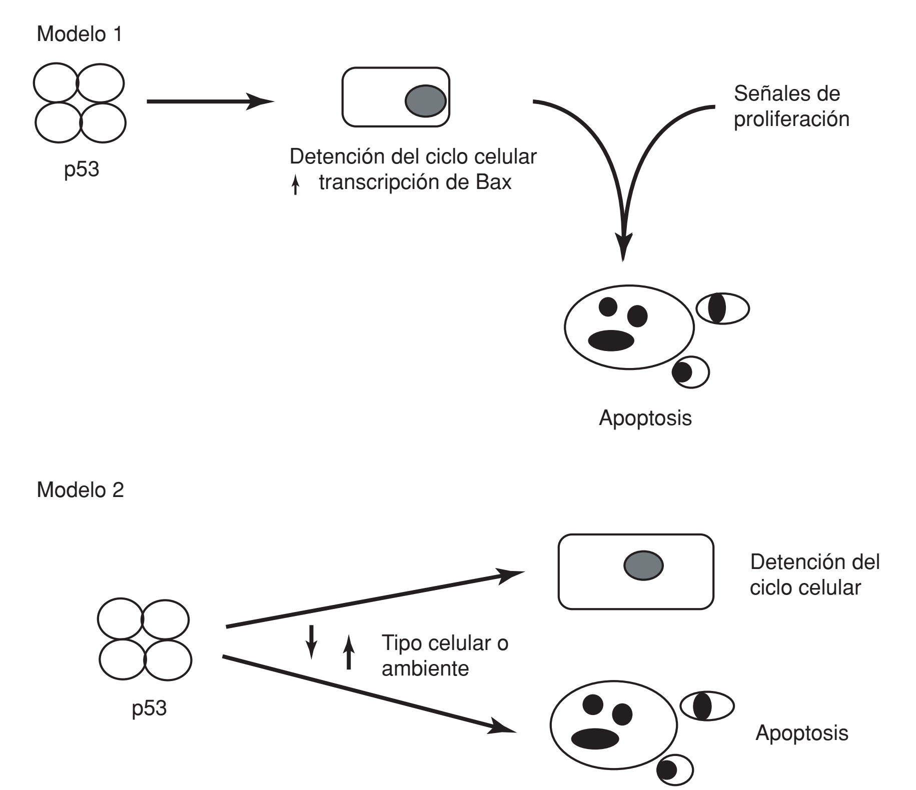


Figura 20-8. Dos modelos posibles de la acción de p53 en la MCP.

Miembros de la familia de Bcl-2 inciden en el control del ciclo celular

La sobreexpresión de *Bcl-2* reduce la proliferación.

Considerando la influencia de moléculas reguladoras del ciclo celular sobre la MCP, resulta interesante saber si también las moléculas que controlan la muerte, como Bcl-2 y Bax, tienen un efecto sobre el control del ciclo celular. Estudios recientes han demostrado que la sobreexpresión de *bcl-2* reduce la proliferación y el recambio de timocitos *in vivo* y retarda la entrada al ciclo celular de timocitos y fibroblastos quiescentes cuando son estimulados con mitógenos (O'Reilly y cols., 1996). Por el contrario, la sobreexpresión de *bax* en ratones transgénicos provoca que al menos el doble de timocitos se encuentren en la fase S, respecto al número observado en ratones silvestres. Al comparar el tiempo que se tardan los timocitos en iniciar la síntesis de DNA cuando las células están sincronizadas, la presencia de Bcl-2 produce un retraso, mientras que la presencia de Bax produce un adelanto respecto al tiempo que toma la entrada a la fase S en las células silvestres. Dicha disminución de la velocidad observada en el ratón transgénico que sobreexpresa *bcl-2* se asocia a un incremento en la cantidad de la proteína p27 kip1, un inhibidor de las cinasas que promueven la progresión del ciclo celular. De manera complementaria, la aceleración de la síntesis de DNA provocada por *bax* en ratones transgénicos se acompaña por una disminución en la cantidad de p27 kip1. Como consecuencia, los niveles de Bcl-2/Bax podrían influir en el momento que ocurre la activación de las cinasas inhibidas por p27 kip1. En el caso de las células que expresan *bax*, el facilitar la activación de las CDK permitiría un progreso más rápido hacia el punto del ciclo celular en que se toma la decisión de vivir o morir. La situación contraria se aplicaría para el caso en que hay un exceso de Bcl-2, cuando el punto de decisión se alcanza más tarde (Brady y cols., 1996). El efecto de Bcl-2 y Bax sobre el ciclo celular va en concordancia con la hipótesis de que el inicio de la MCP depende de procesos proliferativos como la entrada a la fase S, siendo protector retardar el ciclo, y acelerador de la muerte estimular el inicio de la síntesis de DNA.

Conclusiones y perspectivas

Actualmente no se puede dudar de la importancia que tiene la MCP durante el desarrollo embrionario y en la vida adulta de un organismo. El requerimiento de factores extracelulares para que una célula en cultivo sobreviva, así como la multitud de factores de sobrevivencia descritos a la fecha, establecen la tendencia de las células a activar su maquinaria de muerte. Aún más, resulta llamativo que los componentes de esta maquinaria, necesarios para desencadenar la MCP, estén siempre presentes en la mayoría de las células, de tal forma que la síntesis de proteínas no es un requerimiento para que la apoptosis ocurra. No obstante, y como se describió a lo largo del capítulo, la transcripción de componentes de la maquinaria de muerte se encuentra regulada, ya sea de manera tejido-específica como en el caso de *nedd2* (que codifica para caspasa-2), o en respuesta a estímulos específicos

como sucede con *ice* en la ausencia de componentes de la matriz extracelular. Además, la expresión de un número importante de genes de la maquinaria de muerte, como los de las familias Ced-3/Ice (por ejemplo, *ich1, nedd2*), y Ced-9/Bcl2 (por ejemplo, *bcl-x*), se encuentra modulada por un proceso decisivo para su función: el empalme alternativo. Este empalme da lugar a proteínas tan distintas que funcionan ya sea como promotores, o como bloqueadores de la MCP. Así, entonces, si bien experimentalmente todas la células activan la apoptosis en ausencia de síntesis de proteínas, es probable que la regulación de la expresión de los genes que codifican para los componentes de la maquinaria sea determinante.

La identificación de los componentes moleculares de la maquinaria de muerte ha llevado a la indudable conclusión de que ésta se ha originado en una etapa temprana de la evolución de los organismos multicelulares y que sus blancos son aún más antiguos, como pudiera concluirse de la clara actividad de los miembros de los principales componentes de la maquinaria de muerte en levadura. No obstante, esta maquinaria ha aumentado en complejidad conforme el organismo se encuentra más arriba en la escala evolutiva. Por ejemplo, en *C. elegans* sólo se ha identificado una caspasa (CED3), mientras que en *Drosophila melanogaster* se han notificado por lo menos dos, y en los mamíferos existe un arsenal de caspasas capaces de transmitir la señal de muerte; un comportamiento similar se observa en la evolución de los miembros de la familia de *ced-9/bcl-2*. Este incremento en diversidad puede asociarse a una actividad conjunta entre los miembros de una misma familia, ya sea formando heterocomplejos como es el caso de los miembros de la familia de *ced-9/bcl-2*, o participando en cascadas de regulación como en el caso de algunas caspasas. Alternativamente, algunos componentes pueden ser específicos de tejido, activado por señales muy particulares, o redundantes entre ellos.

En contraste al mecanismo de ejecución de la MCP, el mecanismo de activación debiera diferir dependiendo del tipo celular y del activador extracelular, de tal forma que las moléculas responsables estarían conservadas sólo dentro de rutas de transducción comunes. En este sentido resulta interesante que para el gen *ces-2* de *C. elegans,* regulador negativo de la muerte de las células SMN, exista una molécula homóloga, HLF (*hepatic leukemia factor*), con una función similar. Una versión mutante de HLF lo convierte en un activador transcripcional más potente que causa que las células se conviertan en malignas, y su presencia hace que células pre-B se vuelvan resistentes a inductores clásicos de muerte como a la ausencia de factores de sobrevivencia (es decir, IL-3) o irradiación, sin afectar la proliferación (Inaba y cols., 1996); ambas evidencias están de acuerdo con un efecto negativo de HLF sobre la MCP. El gen *ces-2* y HLF pertenecen a la subfamilia PAR (*proline- and acid-rich*) de factores de transcripción que tienen el dominio bZIP (*basic leucine-zipper*) (Metzstein y cols., 1996) y, puesto que comparten un alto grado de similitud tanto en el dominio básico de unión a DNA como en el cierre de leucina, es posible que tengan una especificidad por la unión a secuencias de DNA casi idénticas. Estas observaciones permiten suponer que por lo menos algunos miembros de la familia de factores transcripcionales CES-2/PAR son reguladores de la MCP conserva-

dos en la evolución que actúan en rutas de transducción comunes, o como punto de convergencia de varias rutas de transducción.

A pesar de la cantidad de información que se ha generado en torno a las moléculas que participan en la MCP, aún no se puede establecer con certeza el mecanismo bioquímico por el cual ejercen su efecto. Con los elementos descritos a lo largo del capítulo se puede resumir el proceso de muerte de la siguiente manera. En la primera etapa la maquinaria de muerte se puede encender por dos circunstancias. Una sería por la presencia de un factor que desencadene la muerte interactuando directa o indirectamente con la maquinaria de muerte (por ejemplo, TNFα). Otra sería por la ausencia de un factor que la célula requiere constantemente para impedir que la maquinaria de muerte actúe; en este caso las vías de transducción que se desencadenen por el factor de sobrevivencia recaerían sobre reguladores negativos de la maquinaria de muerte. En una segunda etapa la célula decidirá si vivir o morir dependiendo del equilibrio entre los reguladores de la activación (por ejemplo, proteínas con DM) y los reguladores de la inhibición (por ejemplo, Ces-2, Iap, Dad-1, miembros de la familia de Bcl-2), de tal forma que cooperen para mantener apagada la maquinaria de muerte o para encenderla. La decisión de iniciar el proceso apoptótico también puede estar sujeta a cierto estado de la célula, que favorece (por ejemplo, estado proliferativo) o desfavorece (por ejemplo, estado no proliferativo) la activación de la maquinaria de muerte; el daño al DNA puede ser una condición desfavorable para la sobrevivencia celular. En la tercera etapa, los blancos de los reguladores (positivos y negativos) modificarían su actividad para que, en caso de decidir morir, desencadenen eficientemente el proceso apoptótico. En la actualidad conocemos dos elementos que pueden ser blanco de transductores intracelulares que regulan la muerte celular: miembros de la familia de Bcl-2 (participante en la fase de decisión) y las caspasas. Otro componente fundamental de la maquinaria de muerte es Apaf-1/CED-4 y sus posibles homólogos, pero aún no existen elementos que sugieran una interacción con señales intracelulares de transducción.

La información actual coloca a las caspasas en el punto central del desencadenamiento de la MCP, las cuales directa o indirectamente tienen blancos en distintos compartimentos de la célula. Si bien las caspasas más relevantes, como caspasa 3, se han encontrado localizadas en el citoplasma, el hecho de que sustratos que pudieran ser importantes para la MCP se encuentren en el núcleo sugiere que por lo menos algunas caspasas tienen acceso a este compartimento; la granzima B pudiera ser un candidato, pues se ha logrado detectar en el núcleo. El corte proteolítico de los distintos sustratos debiera ser responsable de los cambios que caracterizan a la apoptosis, así como de hacer eficiente el proceso, ya que algunos sustratos son factores inhibitorios de la muerte, de tal forma que su eliminación pudieran reforzar el proceso de progresión de la apoptosis. No obstante las evidencias que ponen a las caspasas al principio de la apoptosis, un nuevo panorama se está elucidando, donde el proceso de MCP se inicia antes de las caspasas, y donde existen rutas alternas de activación de la MCP que no involucran a estas enzimas, las cuales regularmente convergen con las caspasas para desencadenar eficientemente el proceso de muerte celular. Este panorama se

desprende del efecto tardío de inhibidores de amplio espectro de las caspasas, los cuales bloquean la MCP, pero, a diferencia del efecto inhibitorio de Bcl-2, lo hacen una vez iniciada la muerte y de manera irreversible. También de acuerdo con este panorama, los miembros de la familia de Bcl-2/CED-9 tienen blancos distintos a las caspasas, como pudieran ser los reguladores del estado redox y la calcineurina. En este sentido se vuelve crítico el equilibrio entre los miembros de la familia de Bcl-2 que bloquean y provocan la MCP. Como se mencionó en la Sección 2, la interacción de esta familia y la de las caspasas con Apaf-1/CED-4 es el punto de convergencia de muchas señales que causan la muerte celular.

En conclusión, la MCP es un proceso complejo que merece ser estudiado no sólo por su relevancia durante el funcionamiento normal de los organismos, sino porque su desregulación favorece el surgimiento de enfermedades como el cáncer o las que involucran degeneración celular. Entender tanto el mecanismo por el cual ocurre la MCP como su regulación, incrementará nuestra comprensión sobre la formación y funcionamiento de los organismos y permitirá diseñar terapias más efectivas que las actuales.



Referencias bibliográficas

Adams, J.M. y Cory, S., *TIBS,* **26:** 61-66, 2001.

Alnemri, E.; Fernández-Alnemri, S.T. y Litwack, G., *J. Biol. Chem.,* **270:** 4312-4317, 1995.

Amati, B.; Littlewood, T.D.; Evan, G.I. y Land, H., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **12(13):** 5083-5087, 1993.

Avery, L. y Horvitz, H.R., *Cell,* **51:** 1071-1078, 1987.

Bates, S. y Vousden, K.H., *Current Opinion in Genetics and Development,* **6:** 12-19, 1996.

Beg, A. y Baltimore, D., *Science,* **274:** 782-784, 1996; Van Antwerp, D.J. y cols., *Science*, **274:** 787-789, 1996.

Brady, H.J.M.; Gil-Gómez, G.; Kirberg, J. y Berns, A.J.M., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **15(24):** 6991-7001, 1996.

Budihardjo, I.; Oliver, H.; Lutter, M.; Luo, X. y Wang, X., *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.,* **15:** 269-290, 1999.

Bump, N.J.; Hackett, M.; Hugunin, M.; Seshagiri, S.; Brady, K.; Chen, P.; Ferenz, C.; Franklin, S.; Ghayur, T.; Li, P.; Licari, P.; Mankivich, J.; Shi, L.; Greenberg, A.H.; Miller, L.K. y Wong, W.W., *Science,* **269:** 1885-1888, 1995.

Buttke, T.M. y Sandstrom, P.A., *Immunol. Today,* **15:** 7-10, 1994.

Caelles, C.; Helmberg, A. y Karin, M., *Nature,* **370:** 220-226, 1994.

Chang, D.J.; Rongold, G.M. y Heller, R.A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **188:** 538-546, 1992.

Chen, C.Y. y Faller, D.V., *J. Biol. Chem.,* **271(5):** 2376-2379, 1996.

Chen, P.; Nordstrom, W.; Gish, B. y Abrams, J.M., *Genes & Development,* **10:** 1773-1782, 1996.

Chinnaiyan, A.M. y Dixit, V., *Current Biology,* **6(5):** 555-562, 1996.

Clarke, A. y cols., *Nature,* **359:** 328-330, 1992; Lee, E.H. y cols., *Nature*, **359:** 288-294, 1992; Jacks, T. y cols., *Nature*, **359:** 295-300, 1992.

Clarke, P.G.H., *Anat. Embryol,* **181:** 195-213, 1990.

Colombel, M.; Olsson, C.A.; Ng, P. y Buttyan, R., *Cancer Research,* **52:** 4313-4319, 1992.

Deiss, L.P. y cols., *Genes and Dev.,* **9:** 15-30, 1995.

Driscoll, M. y Chalfie, M., *TINS,* **15(1):** 15-19, 1992.

Duan, H. y Dixit, V., *Nature,* **385:** 86-89, 1997.

Duckett, C.S.; Nava, V.E.; Gedrich, R.W.; Clem, R.J.; Van Dongen, J.L.; Gilfillan, M.C.; Shiels, H.; Hardwick, J.M. y Thompson, C.B., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **15(11):** 2685-2694, 1996.

Dudek, H.; Datta, S.R.; Franke, T.F.; Birnbaum, M.J.; Yao, R.; Cooper, G.M.; Segal, R.A.; Kaplan, D.R. y Greenberg, M.E., *Science,* **275:** 661-665, 1997.

Earshaw, W.C.; Martins, L.M. y Kaufmann, S.H., *Annu. Rev. Biochem.,* **68:** 383-424, 1999.

Enari, M. y cols., *Nature,* **391:** 43-50, 1998; Halenbeck, R. y cols., *Curr. Biol.*, **8:** 537-540, 1998; Liu, X. y cols., *P.N.A.S.*, **95:** 8461-8466, 1998.

Evan, G.; Brown, L.; Whyte, M. y Harrington, E., *Current Opinion in Cell Biology,* **7:** 825-834, 1995.

———— ; Wyllie, A.H.; Gilbert, C.S.; Littlewood, T.D.; Land, H.; Brooks, M.; Waters, C.M.; Penn, L.Z. y Hancock, D.C., *Cell,* **69:** 119-126, 1992.

Farlie, P.G.; Dringen, R.; Rees, S.M.; Kannourakis, G. y Bernard, O., *P.N.A.S.,* **92:** 4397-4401, 1995.

Farrow, S.N.; White, J.H.M.; Martinou, I.; Raven, T.; Punk, K.T.; Grinham, C.J.; Martinou, C.J. y Brown, R., *Nature,* **374:** 731-733, 1995.

Fernandez-Sarabia, M.J. y Bischoff, J.R., *Nature,* **366:** 274-275, 1994.

Fesus, L.; Thomazy, V.; Autuori, F.; Ceru, M.P.; Taresa, E. y Piacentini, M., *FEBS lett.,* **245:** 150-154, 1989.

Fialkow, L.; Chan, C.K.; Rotin, D.; Grinstein, S. y Downey, G.P., *J. Biol. Chem.,* **269:** 31234-31242, 1994.

Freeman, R.S.; Estus, S. y Johnson, M. Jr., *Neuron,* **12:** 343-355, 1994.

Gagliardini, V.; Fernández, P.A.; Lee, R.K.K.; Hannes, C.A.; Rotello, R.J.; Fishman, M.C. y Yuan, J., *Science,* **263:** 826-828, 1994.

Gajewski, T.F. y Thompson, C.B., *Cell,* **87:** 589-592, 1996.

Green, D., *Cell,* **102:** 1-4, 2000.

Greenlund, L.J.S.; Deckwerth, T.L. y Johnson, T.L., *Neuron,* **14:** 303-315, 1995.

Grether, M.E.; Abrams, J.M.; Agapite, J.; White, K. y Steller, H., *Genes and Dev.,* **9:** 1694-1708, 1995.

Grimm, L.M.; Goldberg, A.L.; Poirier, G.G.; Schwartz, L.M. y Osborne, B., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **15(15):** 3835-3844, 1996.

Gu, Y.; Wu, J.; Faucheu, C.; Lalanne, J.L.; Diu, A.; Livingstone, D.J. y Su, M.S.S., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **14:** 1923-1931, 1995.

Haas-Kogan, D.A.; Kogan, S.C.; Levi, D.; Dazin, P.; Tang, A.; Fung, Y.K. e Israel, M.A., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **14:** 461-472, 1995.

Haldar, S.; Jena, N. y Croce, C.M., *P.N.A.S.,* **92:** 4507-4511, 1995.

———— ; Negrini, M.; Monne, M.; Sabbioni, S. y Croce, C.M., *Cancer Research,* **54:** 2095-2097, 1994.

Hanada, M.; Aimé-Sempé, C.; Sato, T. y Reed, J., *J. Biol. Chem.,* **270:** 11962-11968, 1995.

Hay, B.A.; Wassarman, D.A. y Rubin, G.M., *Cell,* **83:** 1253-1262, 1995.

Hedgecock, E.M.; Sulston, J.E. y Thomson, J.N., *Science,* **220:** 1277-1279, 1983.

Hoang, A.T.; Cohen, K.J.; Barrett, J.F.; Bergstrom, D.A. y Dang, C.V., *P.N.A.S.,* **91:** 6875-6879, 1994.

Hockenberry, D.M.; Zutter, M.; Hickey, W.; Nahm, M. y Korsmeyer, S.J., *P.N.A.S.,* **88:** 6961-6965, 1991.

————; Olvai, Z.N.; Yin, X.M.; Milliman, C.L. y Korsmeyer, S.J., *Cell,* **75:** 241-251, 1993.

Hugunin, M.; Quintal, L.J.; Mancovich, J.A. y Ghayur, T., *J. Biol. Chem.,* **271:** 3517-3522, 1996.
Inaba, T.; Inukai, T.; Yoshihara, T.; Seyschab, H.; Ashmun, R.A.; Canman, C.E.; Laken, S.J.; Kastan, M.B. y Look, T., *Nature,* **382:** 541-544, 1996.
Jabs, T.; Dietrich, R.A. y Dang, J.L., *Science,* **273:** 1853-1856, 1996.
Jacobson, M. y Raff, M.C., *Nature,* **374:** 814-816, 1995.
Janicke, S.U.; Walker, P.A.; Lin, X.Y. y Porter, A.G., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **15(24):** 6969-6978, 1996.
Jiang, Y.; Woronicz, J.D. y cols., *Science,* **283:** 543-546, 1999.
Kane, D.J. y cols., *Science,* **262:** 1274-1277, 1993.
Kaufmann, S.H.; Desnoyers, S.; Ottaviano, Y.; Davidson, N.E. y Poirier, G.G., *Cancer Res.,* **53:** 3976-3985, 1993.
Khan, A.A.; Soloski, M.J.; Sharp, A.H.; Schilling, G.; Sabatini, D.M.; Li, S.; Ross, C.A. y Snyder, S.H., *Science,* **273:** 503-507, 1996.
Kiuda, K.; Lippke, J.A.; Ku, G.; Harding, M.W.; Livingstone, D.J.; Su, M.S.S. y Flavell, R.A., *Science,* **267:** 2000-2003, 1995.
Krajewski, S.; Tanaka, S.; Takayama, S.; Schibler, M.J.; Fenton, W. y Reed, J., *Cancer Res.,* **53:** 4701-4714, 1993.
Lei, S.Z. y cols., *Neuron,* **8:** 1087-1099, 1992.
Levine, A.; Pennel, R.L.; Alvarez, M.E.; Palmer, R. y Lamb, C., *Curr. Biol.,* **6(4):** 427-437, 1996.
Li, P.; Allen, H.; Banerjee, S.; Franklin, L.; Herzog, L.; Johnston, C.; McDowell, J.; Paskind, M.; Rodman, L.; Salfeld, J.; Towne, E.; Tracey, D.; Wardwell, S.; Wei, F.Y.; Wong, W.; Kamen, R. y Seshadri, T., *Cell,* **80:** 401-411, 1995.
Liston, P.; Roy, N.; Tamai, K.; Lefevbre, C.; Baird, S.; ChertonHovart, G. y cols., *Nature,* 349-352, 1996.
Lo, Y.Y.C. y Cruz, T.F., *J. Biol. Chem.,* **270(20):** 11727-11730, 1995.
Macleod, K.F.; Hu, Y. y Jacks, T., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **15(22):** 6178-6188, 1996.
Martin, D.P.; Schmidt, R.E.; DiStefano, P.S.; Lowry, O.H.; Carter, J.C. y Johnson, E.M. Jr., *J. Cell Biol.,* **106:** 829-844, 1988.
Martin y cols., *J. Biol. Chem.,* **270:** 6425, 1995.
Matsuda, M.; Masutani, H.; Nakamura, H. y cols., *J. Immunol.,* **147:** 3837-3841, 1991.
McConkey, D. y Orrenius, S., *Trends Cell Biol.,* **4:** 370-375, 1994.
McDonnell, T.J.; Deane, N.; Platt, F.M.; Nuñez, G.; Jaeger, U.; McKearn, J.P. y Korsmeyer, S.J., *Cell,* **57:** 79-88, 1989.
Merry, D.E.; Veis, D.J.; Hickey, W.F. y Korsmeyer, S.J., *Development,* **120:** 3301-3311, 1994.
Metzstein, M.M.; Hengartner, M.O.; Tsung, N.; Ellis, R. y Horvitz, H.R., *Nature,* **382:** 545-547, 1996.
Milligan, C.E.; Prevette, D.; Yaginuma, H.; Homma, S.; Cardwell, C.; Fritz, L.C.; Tomaselli, K.J.; Oppenheim, R.W. y Schwartz, L.M., *Neuron,* **15:** 385-393, 1995.
Miura, M.; Zhu, H.; Rotello, R.; Hartwieg, A. y Yuan, J., *Cell,* **75:** 653-660, 1993.
Miyashita, T. y Reed, J., *Cell,* **80:** 293-299, 1995.
Miyayashita, T.; Krajewski, S.; Krajewska, M.; Wang, H.G.; Lin, H.K.; Liebermann, D.A.; Hoffman, B. y Reed, J., *Oncogene,* **9:** 1799-1805, 1994.
Monaghan, P.; Robertson, D.; Amos, T.A.S.; Dyer, M.J.S.; Mason, D.Y. y Greaves, M.F., *Histoche. Citochem.,* **40:** 1819-1825, 1992.
Muchmore, S.W. y cols., *Nature,* **381:** 335, 1996; Minn, A.J. y cols., *Nature,* **385:** 353-357, 1997.
Nuñez, G.; Hockenberry, D.; McDonnell, T.J.; Sorensen, C.M. y Korsmeyer, S.J., *Nature,* **353:** 71-73, 1991.

O'Reilly, L.A.; Huang, D.C.S. y Strasser, A., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **15(24):** 6979-6990, 1996.

Obeid, L.M. y Hannun, Y.A., *J. Cell Biochem.,* **58:** 191-198, 1995.

Pahl, H.L. y Baeuerle, P.A., *Curr. Op. Cell Biol.,* **8:** 340-347, 1996.

Parchment, R.R., *Int. J. Dev. Biol.,* **37:** 75-83, 1993.

Pitti, R.M; Marsters, S.A. y cols., *Nature,* **396:** 699-703, 1998.

Pronk, G.J.; Ramer, K.; Amiri, P. y Williams, L.T., *Science,* **271:** 808-810, 1996.

Raff, M.C.; Barres, B.A.; Burne, J.F.; Coles, H.S.; Ishizaki, Y. y Jacobson, M.D., *Science,* **242:** 695-700, 1993.

Reed, J., *J. Cell Biol.,* **124(1, 2):** 1-6, 1994.

Richter, C., *FEBS letter,* **325(1, 2):** 104-107, 1993.

Roffler-Tarlov, S.; Brown, J.J.G.; Tarlov, E.; Stolarov, J.; Chapman, D.L.; Alexiou, M. y Papaicannou, V.E., *Development,* **122:** 1-9, 1996.

Rowan, S.; Ludwig, R.L.; Haupt, Y.; Bates, S.; Lu, X.; Oren, M. y Vousden, K.H., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* 1996.

Roy, N.; Mahadevan, M.S.; McLean, M.; Shutler, G.; Yaraghi, Z.; Farahani, R.; Baird, S.; Besner-Jonhston, A.; Lefebvre, C.; Kang, X.; Salih, M.; Aubry, H.; Tamai, K.; Guan, X.; Icannou, P.; Crawford, T.O.; Jong, P.J.; Surth, L.; Ikeda, J.E.; Korneluk, R.G. y MacKenzle, A., *Cell,* **80:** 167-178, 1995.

Sadoul, R.; Fernandez, P.A.; Quiquerez, A.L.; Martinou, I.; Maki, M.; Schroter, M.; Becherer, J.D.; Irmler, M.; Tschopp, J. y Martinou, J.C., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **15(15):** 3845-3854, 1996.

Santana, P.; Peña, L.A.; Haimovitz-Friedman, A.; Martin, S.; Green, D.; McLoughlin; Cordon-Cardo, C.; Schuchman, E.H.; Fuks, Z. y Kolesnick, R., *Cell,* **86:** 189-199, 1996.

Schmidt, K.N.; Amstad, P.; Cerutti, P. y Baeuerle, P.A., *Chemistry and Biol.,* **2:** 13-22, 1995.

Schreiber, V.; Hunting, D.; Trucco, C.; Gowans, B.; Grunwald, D.; Murcia, G. y Murcia, J.M., *P.N.A.S.,* **92:** 4753-4757, 1995.

Schwartz, L.M.; Kosz, L. y Kay, B.K., *P.N.A.S.,* **87:** 6594-6598, 1990.

Shen, Y. y Shenk, T., *P.N.A.S.,* **91:** 8940-8944, 1994.

Shi, L.; Nishioka, W.K.; Th'ng, J.; Bradbury, E.M.; Litchfield, D.W. y Greenberg, A.H., *Science,* **263:** 1143-1145, 1994.

Shimizu, S. y cols., *Nature,* **374:** 814-816, 1995.

——— y cols., *Nature,* **399:** 483-487, 1999.

Shwartzman, R.A. y Cidlowski, J.A., *Endocrine Reviews,* **14(2):** 133-151, 1993.

Smeyne, R.J.; Vendrell, M.; Hayward, M.; Baker, S.J.; Miao, G.G.; Schilling, K.; Robertson, L.M.; Curran, T. y Morgan, J.I., *Nature,* **363:** 166-169, 1993.

Steinman, H.M., *J. Biol. Chem.,* **270(8):** 3487-3490, 1995.

Steller, H., *Science,* **267:** 1445-1449, 1995.

Strack, P.R.; Frey, M.W.; Rizzo, C.J.; Cordov, B.; George, H.J.; Meade, R.; Ho, S.P.; Corman, J.; Tritch, R. y Korant, B.D., *P.N.A.S.,* **93:** 9571-9576, 1996.

Sugimoto, A.; Friesen, P.D. y Rothman, J.H., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **13(9):** 2023-2028, 1994.

———; Hozak, R.R.; Nakashima, T.; Nishimoto, T. y Rothman, J.H., **14(18):** 4434-4441, 1995.

Sun, Y. y Oberley, L.W., *Free Rad. Biol. Med.,* **21(3):** 335-348, 1996.

Sundaresan, M.; Yu, Z.X.; Ferrans, V.J.; Irani, K. y Finkel, T., *Science,* **270:** 296-299, 1995.

Takayama, S.; Sato, T.; Krajewski, S.; Kochel, K.; Irie, S.; Millan, J.A. y Reed, J.C., *Cell,* **80:** 279-284, 1995.

Vaux, D.L.; Wissman, I.L. y Kim, S.K., *Science,* **258:** 1955-1957, 1992.
Veis, D.J.; Sorenso, Ch.M.; Shutter, J.R. y Korsmeyer, S.J., *Cell,* **75:** 229-240, 1993.
Wang, H.; Rapp, U.R. y Reed, J., *Cell,* **87:** 629-638, 1996.
Wang, H.G.; Millan, J.A.; Cox, A.D.; Der, C.J.; Rapp, U.R.; Beck, T.; Zha, H. y Reed, J.C., *J. Biol. Chem.,* **129:** 1103-1114, 1995.
Wang, L.; Miura, M.; Bergeron, L.; Zhu, H. y Yuan, J., *Cell,* **78:** 739-750, 1994.
Wang, Z.Q.; Auer, B.; Stingl, L.; Berhammer, H.; Haidacher, D.; Schweiger, M. y cols., *Genes and Dev.,* **9:** 509-520, 1995.
White, E., *Genes and Development,* **7:** 2277-2284, 1993.
White, K.; Grether, M.E.; Abrams, J.M.; Young, L.; Farrel, K. y Steller, H., *Science,* **264:** 677-683, 1994.
——— ; Tahaoglu, E. y Steller, H., *Science,* **271:** 805-807, 1996.
Wong, G.H.; Elwell, J.H.; Oberley, L.W. y Goeddel, D.V., *Cell,* **58:** 923-931, 1989.
Yang, E.; Zha, J.; Jockel, J.; Boise, L.H.; Thompson, C.B. y Korsmeyer, S.J., *Cell,* **80:** 285-291, 1995.
Yang, J. y cols., "Preventions of apoptosis", *Science,* **275:** 1129-1132, 1997; Kluck, R.M. y cols. *Science*, **275:** 1132-1136, 1997.
Yang, Y.; Fang, S. y cols., *Science,* **288:** 874-877, 2000.
Yin, C.; Knudson, C.M.; Korsmeyer, S.J. y Van Dyke, T., *Nature,* **385:** 637-640, 1997.
Yin, X.M.; Oltvai, Z.N. y Korsmeyer, S.J., *Nature,* **369:** 321-323, 1994.
Yuan, J.; Shaham, S.; Ledoux, S.; Ellis, H.M. y Horvitz, H.R., *Cell,* **75:** 641-652, 1993.
Zhu, W.; Cowie, A.; Wasfy, G.W.; Penn, L.; Leber, B. y Andrews, D.W., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **15(8):** 4130-4141, 1996.

CAPÍTULO 21

LA CÉLULA CANCEROSA

Alejandro García Carrancá



El cáncer resulta de la acumulación de daños en genes cuyos productos controlan funciones esenciales para las células normales

El cáncer es una enfermedad genética.

Actualmente se acepta que el cáncer es una enfermedad genética, resultado del cúmulo de alteraciones en un conjunto de genes que pertenecen a dos grandes grupos, los oncogenes y los genes supresores de tumores, cuyos productos ejercen funciones básicas para el buen funcionamiento, crecimiento y muerte de todas nuestras células. En cierto modo, resulta irónico que el Dr. Peyton Rous, una de las personas que más contribuyó al conocimiento actual de este proceso, haya dicho, en sus últimos días de vida, que las alteraciones genéticas no parecerían estar en el origen de la mayoría de los tumores humanos. El Dr. Rous, quien finalmente fue galardonado con el premio Nobel de Medicina y Fisiología, fue el primero en dar a conocer la existencia de un agente viral (ahora sabemos que es un retrovirus), capaz de inducir rápidamente la formación de tumores sólidos en pollos. El descubrimiento de este virus que actualmente lleva su nombre, virus del sarcoma de Rous, abrió el camino para que muchos investigadores mostraran la existencia de otros agentes virales similares, con capacidad para inducir la formación rápida de tumores, y ahora conocidos como retrovirus transductores, o retrovirus rápidos, u oncogénicos.

La transformación maligna puede ser vista ahora en términos de alteraciones específicas de un reducido número de reguladores genéticos que trabajan dentro de las células para controlar el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular.

En los últimos años ha habido un avance impresionante en el conocimiento de las alteraciones específicas que participan en el desarrollo de algunos tipos de tumores, como lo es el caso del carcinoma colorrectal. En este caso, se conocen con detalle los cambios genéticos en genes específicos que resultan en la progresión desde un adenoma hasta un carcinoma (Kinzler y Vogelstein, 1996). En particular, las alteraciones ocurren de manera

combinada tanto en oncogenes, como en genes supresores de tumores e involucran algunos de los miembros más prominentes de estas familias, como es el caso de uno de los miembros de la familia de genes *ras* y de *p53* (ver más adelante).



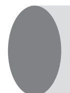
Las diferentes manifestaciones del cáncer reflejan las características de las células de las cuales se originaron

> Las células de los tumores malignos presentan dos características que las distinguen de las normales: 1) se reproducen de manera descontrolada, y 2) son capaces de invadir y colonizar tejidos y órganos distantes, en lugares donde normalmente no pueden crecer.

> Un tumor benigno puede ser curado completamente, a diferencia de los tumores malignos que forman metástasis a distancia y que probablemente terminarán con la vida del paciente.

Las células de los tumores malignos presentan dos características que las distinguen de las normales: 1) se reproducen de manera descontrolada, y 2) son capaces de invadir y colonizar tejidos y órganos distantes, en lugares donde normalmente no pueden crecer. La combinación desafortunada de estas características es la que hace tan peligrosa y mortal a la mayoría de las formas del cáncer; las células son anormales y además capaces de crecer en lugares donde normalmente no lo pueden hacer. Así pues, si en un momento dado una célula aislada presenta características aberrantes, pero su crecimiento está restringido como el de sus vecinas, no ocurrirá un daño mayor. Sin embargo, si su crecimiento fuese desordenado, las consecuencias seguramente serían devastadoras, pues terminarían con la vida del organismo que las originó. Es por ello que un tumor benigno puede ser curado completamente, a diferencia de los tumores malignos que forman metástasis a distancia y que probablemente terminarán con la vida del paciente.

Los tumores se clasifican generalmente según el origen de las células de donde surgen y se agrupan en: 1) carcinomas, aquellos cuyo origen son las células epiteliales; 2) sarcomas, cuyo origen son las células del tejido conectivo y las células musculares (tejidos blandos), y 3) aquellos que no se ajustan a ninguna de las dos categorías anteriores y que incluyen la leucemia y los tumores del sistema nervioso.



La mayoría de los tumores se origina de una sola célula aberrante

> Todas las células del tumor y sus metástasis se originan, en la mayoría de las ocasiones, a partir de una sola célula aberrante.

Aun cuando un individuo presenta un cáncer diseminado y con múltiples metástasis a distancia, en la mayoría de las ocasiones su origen puede ser trazado a un tejido y a un tipo histológico precisos, a partir de donde se originaron y se diseminaron todas y cada una de las células tumorales hacia los distintos lugares que ahora colonizan. Es decir, todas las células del tumor y sus metástasis se originan, en la mayoría de las ocasiones, a partir de una sola célula aberrante. En algunas ocasiones esto puede ser claramente demostrado, como en el caso de la leucemia crónica mielogénica, en donde se observa consistentemente una alteración característica que consiste en la presencia del llamado cromosoma Filadelfia (Phi) y que se caracteriza por la translocación recíproca de los cromosomas 9 y 22, creando una fusión de los genes *abl* y *bcr*. En aquellos casos donde se ha podido analizar

con detalle el sitio del rompimiento, se ha podido establecer que todas las células tumorales del individuo presentan la misma ruptura, lo cual demuestra que todas ellas tienen un origen común.

Las células cancerosas podrían ser descritas, como lo ha mencionado el Dr. Bishop, como células descarriadas, es decir, células que se comportan de manera aberrante y alocada, incluso contra los cánones establecidos por el concierto de las demás células que forman un tejido (Bishop, 1991).



Las mutaciones en el DNA probablemente están en el origen de todos los tumores

Diversos tipos de estudios sugieren que los daños al material genético de las células están en el origen del cáncer. Por ejemplo, se conoce perfectamente que existe una estrecha correlación entre las sustancias carcinogénicas (producen cáncer) y las mutagénicas (producen cambio y daños al DNA; mutaciones). Es decir, el potencial de algunas de ellas para producir cáncer se correlaciona generalmente con su capacidad para producir mutaciones en el DNA. Lo anterior refleja la participación de estas sustancias en el desarrollo de una de las etapas conocidas para el desarrollo de los tumores. Desde hace mucho tiempo, y en ello también contribuyó grandemente el Dr. Peyton Rous, se han establecido distintas etapas en el desarrollo de los tumores. Se reconoce una etapa de *iniciación*, la cual está representada por daños al material genético. Otra etapa corresponde a la *promoción*, en donde algunas células con material genético dañado crecen y por ende expanden materialmente el número de clonas con capacidad para adquirir más daños y, al final, generar células tumorales. Por último, se reconoce una etapa llamada de *progresión*, donde justamente se generan algunas células que han acumulado suficientes daños para formar ahora un tumor (figura 21.1).



Los virus tumorales de DNA y algunos retrovirus contribuyeron de manera significativa a las investigaciones contemporáneas del cáncer

Los estudios que dieron origen en gran medida a las investigaciones contemporáneas del cáncer humano involucraron el empleo de agentes virales.

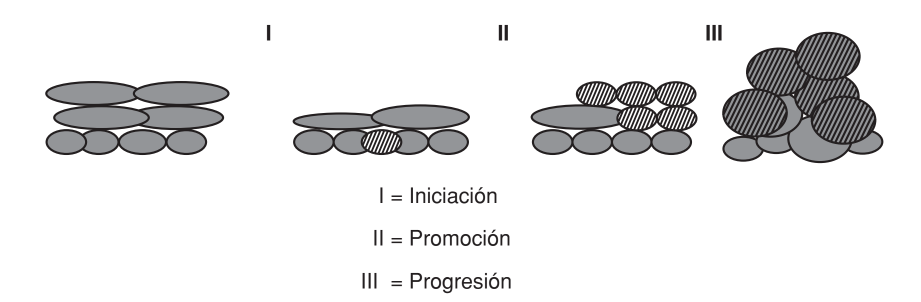


Figura 21-1. Las distintas etapas en el desarrollo de los tumores del cáncer.

Por un lado, los virus tumorales de DNA, como los poliomavirus y el virus SV40 y, más recientemente, los adenovirus y papilomavirus y, por el otro, los retrovirus, entre ellos a la cabeza por algún tiempo el ya mencionado virus del sarcoma de Rous (RSV). Las observaciones que mostraron que las células en cultivo infectadas con estos virus adquieren características propias de las células tumorales, indicaron por un lado, que la naturaleza de la transformación maligna, y por ende del cáncer, podía ser recapitulada en sistemas *in vitro* y, por el otro, contribuyeron al desarrollo actual de las bases moleculares del cáncer, al mostrar que los genomas pequeños virales (con un millón de veces menos DNA que las células) son suficientes para inducir un proceso tan complejo como el cáncer. Como lo menciona atinadamente el Dr. H. Varmus, "estos hallazgos destruyeron de golpe los mitos y viejos conceptos que señalaban al cáncer como un proceso tan complejo que sólo podía reproducirse en los propios organismos". Así había nacido la era moderna en el estudio de la transformación maligna y el cáncer.

Los retrovirus portan genes cuyo estudio permitió que a la fecha se conozcan más de un centenar de genes involucrados en procesos fundamentales, como el control del crecimiento, la diferenciación, la muerte y el ciclo celular. Los adenovirus, y más recientemente los papilomavirus, han permitido identificar la naturaleza de proteínas claves en el control de la muerte programada y el ciclo celular, dado que al interaccionar con estos productos "maestros" alteran los mecanismos que controlan estos procesos.



Los retrovirus transductores acarrean secuencias llamadas oncogenes, capaces de transformar células normales

El descubrimiento del virus del sarcoma de Rous (RSV) abrió el camino para que muchos investigadores mostraran la existencia de agentes similares, todos capaces de inducir rápidamente la formación de tumores en animales. El análisis de algunos de estos retrovirus permitió encontrar que sólo una porción de su genoma se requiere para inducir el fenotipo maligno. De manera análoga, también se pudo mostrar que esta región, denominada *onc* (del griego *oncos*, maligno) es dispensable para el ciclo normal del retrovirus en cuestión. Es decir, el retrovirus es capaz de completar normalmente todo su ciclo en ausencia de la secuencia *onc*. Dicho de otra manera, se había identificado una región en el genoma de algunos retrovirus rápidos (onc) que tiene la capacidad de inducir el crecimiento descontrolado de células aparentemente normales. El estudio de la naturaleza de estas secuencias, y en particular su origen, llevaron a un descubrimiento seminal que abrió las puertas a nuevas líneas de investigación que permitieron consolidar el estudio moderno del cáncer.

Tabla 21-1. Los oncogenes conocidos a la fecha.

Gen	Función del producto	Localización
Celulares y virales		
abl	Tirosina-cinasa	Núcleo, citoplasma
akt1	Serina-treonina-cinasa	Citoplasma, v-akt está miristilada
Familia Bcl		
bcl1	Translocado en linfomas de células B	
bcl2	Reguladores de muerte celular; miembro de familia que incluye: Bax, Bad, Bclx; homólogo de Ced9	Membranas intracelulares
bcl3	Probablemente factor de transcripción	Núcleo
bcr	Serina-treonina-cinasa	Citoplasma
cbl	Transducción de señales	Citoplasma
cdk4	Cinasa dependiente de ciclina	Núcleo
crk	Proteína adaptadora	Citoplasma
csFr-fms	Receptor del factor estimulador de colonias 1	Proteína transmembranal
dbl	Proteína G	Citoplasma, se asocia con la actina del citoesqueleto
Familia erb		
erbB-1 (EGFR)	Receptor del factor de crecimiento epidermal	Membrana plasmática
erbB-2/neu (HER2)	Tirosina-cinasa tipo receptor, activado por NGR	Membrana perinuclear
erbB-3 (HER3)	Receptor tirosina-cinasa	Membrana plasmática
erbB-4 (HER4)	Heterodimeriza con EGFR, HER2 Y HER4	Membrana plasmática
Familia ets	Factores de transcripción	Núcelo
ets1	Interactúa con proteínas Jun, forma complejos	
ets2	Se requiere para ruptura germinal de oocitos de *Xenopus*	
erg	Incluye erg1 y erg2	
fli1	80% similar a erg2, sitios de unión a DNA idénticos	
Familia fos	Factores de transcripción	Núcleo
c-fos	Gen inmediato temprano	
fos B	Expresión ligeramente desfasada con respecto de cfos	
fos B2	También > fos, retiene capacidad de formar dímeros con Jun	
fra-1	Descrito, junto con fra-2, como antígeno relacionado a fos	
fra-2	Forma complejos con la subunidad p50 de NF-*k*B	
fes(fps)	Proteína tirosina-cinasa citoplasmática	Citoplasma
Familia jun	Factores de transcripción	Núcleo
c-jun	Forma heterodímeros y se une a los sitios AP-1	
junB	Los homodímeros se unen pobremente al DNA	
junD	Antagoniza la acción de otros miembros de la familia	
met	Receptor tirosina-cinasa, une al factor de crecimiento de hepatocitos	
myb	Factores de transcripción, incluye MYBA y MYBB	
Familia Myc	Factores de transcripción	Núcleo
c-myc	Familia de proteínas HLH/LZ	
L-myc		
N-myc		
S-Myc		
max	Proteína ubicua, pequeña (22 kDa), forma dímeros con myc	
mad		
mxi1		
Familia raf	Proteínas serina-treonina-cinasa	
raf1(Raf-1)	Ubicuo	Citosol
rafA1(Araf-1)	En tejidos urogenitales	Citosol
rafB1(Braf-1)	Cerebro, testículos, linaje hematopoyético	Citosol
mos	Proteína serina-treonina-cinasa	Citoplasma, núcleo

(continúa)

Tabla 21-1. Continuación

Gen	Función del producto	Localización
Familia ras	Transductores de señales, proteínas G	Citoplasma, cara interna membrana
Ha-ras	De la cepa Harvey, hidrólisis de GTP	
Ki-ras	De la cepa Kirsten	
N-ras		
rel	Factor de transcripción de la familia NF-*k*B	Núcleo
ret	Receptor tirosinas-cinasa, ligando es GDNF	Membrana plasmática
Familia src	Tirosina-cinasa no-receptores	Cara citoplasmática de la membrana
src	Incluye **fgr, lyn, lck,** homólogo al oncogén del virus del sarcoma de Rous (RSV)	
fyn	Expresión aumenta por la estimulación del receptor de células T	
hck	Linaje específico de monocitos y granulocitos	
vav	Factor de recambio de nucleótidos de la familia Rho	Citoplasma y núcleo



Los oncogenes virales tienen gran parecido con genes normales, cuya función correcta es esencial para nuestras células

En nuestro genoma hay genes productores de cáncer, es decir, genes que al ser acarreados por algunos retrovirus y expresarse de manera alterada son capaces de inducir la formación de tumores.

Cuando en 1976 el grupo de investigadores encabezados por los Drs. Mike Bishop y Harold Varmus comunicó el sorprendente hallazgo de la existencia de secuencias homólogas al oncogén *src*, en células de pollos normales, de humano, e incluso en las de la mosca de la fruta y las levaduras, se abrió una de las páginas más brillantes en la historia de la oncología moderna. Es decir, se había mostrado la existencia en nuestro genoma de genes productores de cáncer, genes que al ser acarreados por algunos retrovirus y expresarse de manera alterada son capaces de inducir la formación de tumores. Este hallazgo inspiró el trabajo de varios grupos de investigadores, a finales de la década de 1970, para iniciar la búsqueda de oncogenes en los tumores humanos.

Varios investigadores pensaron que, si por un lado existen en el genoma de algunos virus secuencias capaces de inducir la formación de tumores y, por otro, estas secuencias forman parte de nuestro genoma, sería posible encontrar secuencias similares en los tumores humanos.

Para buscar estas secuencias, los investigadores emplearon un tumor humano de vejiga, o células derivadas de él, y para empezar fragmentaron el DNA de las células tumorales y lo introdujeron en fibroblastos de ratón en cultivo. Posteriormente, buscaron la aparición de células de ratón transformadas (que hubieran adquirido nuevas propiedades), reflejado esto por la aparición de focos de transformación, donde virtualmente las células transformadas crecen apiladas unas sobre otras. Para evitar que la aparición de estas células se debiese a un proceso al azar, los investigadores repitieron el procedimiento, pero ahora con el DNA de las células de ratón que formaban focos. Nuevamente buscaron la aparición de células de ra-

tón que presentaran las características transformadas y las identificaron. Con el DNA de alguna de estas clonas, se crearon bibliotecas genómicas en fagos (virus de bacterias), es decir, un conjunto tal de fagos donde estuvieran representadas todas las secuencias del DNA de estas clonas transformadas, aparentemente por algún oncogén humano. Los fagos fueron plaqueados sobre un tapiz bacteriano, el DNA transferido a una membrana de nitrocelulosa y las secuencias humanas presentes, muy probablemente responsables de la transformación de las células de ratón, localizadas usando como sonda secuencias que caracterizan los genomas humanos, pues se encuentran altamente repetidas en ellos, las secuencias Alu. Se identificaron clonas positivas, que efectivamente eran de origen humano y transformantes.

Había sido identificado de esta manera el primer oncogen humano. Había ahora que conocer el o los defectos que lo hacían transformante, su naturaleza y su posible parecido con otras secuencias conocidas. Los investigadores no tuvieron que preocuparse, ni tuvieron que discutir por el nombre de este nuevo gen, pues pronto supieron que se trataba de la secuencia homóloga a aquella previamente identificada en el oncogén del virus de sarcomas de rata de la cepa Harvey. El primer oncogén humano fue entonces bautizado como Ha-*ras*, pues, como se mencionó, era el homólogo del gen Ha-*ras,* cepa *Ha*rvey del virus que produce en *ra*tas *s*arcomas.

Resulta sorprendente el hecho que el oncogén Ha-*ras* fue transducido virtualmente en las narices del Profesor Harvey, quien en realidad trabajaba con un retrovirus lento que producía leucemia en ratones. Al obtener el suero de una rata, donde se producían los virus para estudio, el Profesor Harvey encontró que ahora la preparación producía la muerte rápida de ratones lactantes. Al inocular este suero en ratas, se percató que se inducía la formación de sarcomas en ellas y que, como ahora es de esperarse, el genoma de este retrovirus había "pescado" e incluso virtualmente "clonado" un oncogén del genoma de las ratas.

Si bien actualmente conocemos más de 100 oncogenes distintos (tabla 21-1), sólo algunos de ellos han sido encontrados alterados de manera consistente en los tumores humanos (tabla 21-2).

Tabla 21-2. Algunos oncogenes identificados en el cáncer humano.

Nombre	Localización cromosómica	Principales neoplasias asociadas
abl	9q34.1	CML; 90% de los casos incluye la translocación equilibrada t(9;22)(q34;q11)
akt1	14q32	Adenocarcinoma gástrico
bcr	22q11.2	Cromosoma Filadelfia involucra translocación bcr y abl
cbl	11q23.3-qter	En leucemia Ph* alteraciones en líneas celulares
cdk4	12q13	Amplificado en 50% de glioblastomas
crk	17p13	Región cromosómica frecuentemente involucra LOH o deleción
dbl	Xq27	Expresado en sarcomas de Ewing
myc	8q24	Linfoma de Burkitt
ras	Ha–,11p15.5;Ki-,12p12.1 y N-,1p13	Carcinomas
rel	2p13	Linfoma no-Hodking
ret	10q11.2	Carcinoma papilar de tiroides



Lo genes supresores de tumores fueron identificados por su naturaleza recesiva

En el desarrollo de un tumor, se han descrito características de las células tumorales que permiten identificar pasos o etapas en su desarrollo (figura 21-1). Una de ellas es la adquisición de propiedades de crecimiento ilimitado y que actualmente conocemos como "inmortalización". Otro proceso importante lo constituye la adquisición de la capacidad de formar tumores y que actualmente llamamos "tumorigenicidad". El estudio de la naturaleza genética de esta última característica, propia de todos los tumores avanzados, reveló la existencia de un grupo muy importante de genes que participan de manera fundamental en el desarrollo de los tumores en humanos: los genes supresores de tumores.

Los genes supresores de tumores son un grupo muy importante de genes que participan de manera fundamental en el desarrollo de los tumores en humanos.

Hace cerca de tres décadas, varios grupos de investigadores se propusieron determinar si la tumorigenicidad característica de todas las neoplasias es de naturaleza dominante o recesiva (figura 21-2). Para ello, decidieron fusionar distintos tipos de células, unas con características tumorigénicas y otras normales. Los experimentos iniciales dieron resultados poco claros, e incluso confusos, pero, cuando las técnicas de fusión de células humanas fueron perfeccionadas, el resultado fue contundente: la tumorigenicidad es una característica de naturaleza recesiva. Esto puso de manifiesto la existencia de genes cuya ausencia, o cuya pérdida de función, contribuye de manera significativa en el desarrollo de los tumores.

Una línea de investigación que ha contribuido, y lo sigue haciendo, en la identificación de genes supresores lo constituye el estudio de las alteraciones cromosómicas específicas que se presentan en algunos tipos de neoplasias, como la leucemia. En las células malignas de estos pacientes, se observan alteraciones que usualmente reflejan la pérdida consistente de ciertas regiones cromosómicas. La existencia de alteraciones en humanos, donde se eliminan ciertas regiones específicas de algunos cromosomas, ha permitido la clonación de varios genes supresores, comenzando por el ya famoso gen del retinoblastoma (Rb). Actualmente la lista de genes supresores se incrementa de manera continua y se espera que esta tendencia continúe durante algunos años (Levine, 1993).

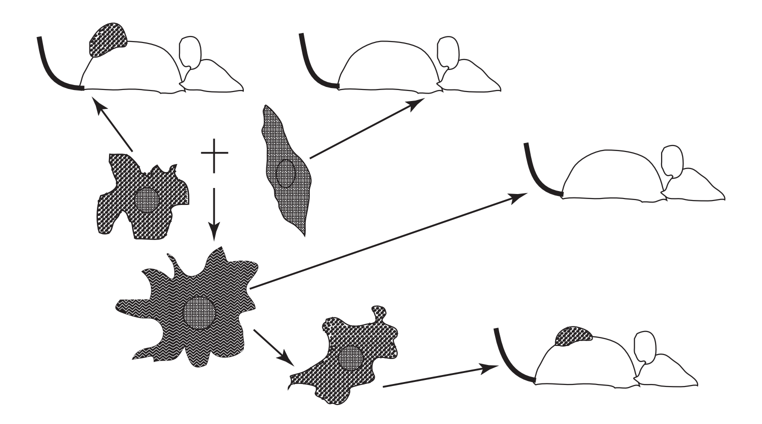


Figura 21-2. La naturaleza recesiva de algunos genes que participan en el desarrollo del cáncer.

La participación de algunos productos de los virus tumorales de DNA (adenovirus, papilomavirus y SV40), en la alteración de los controles normales del ciclo y la muerte celular, ha permitido un avance significativo en el conocimiento de los mecanismos moleculares de la función de varios productos de genes supresores, como es el caso específico de los productos de los genes RB y p53. En particular, las funciones de la proteína p53 han sido intensamente estudiadas durante los últimos años, lo que ha permitido conocer los procesos moleculares que hacen que esta proteína participe de manera muy importante en los mecanismos de seguridad y salvaguarda de la integridad del genoma de nuestras células, así como en la respuesta a las infecciones virales, además de su rol como guardián del genoma y controlador del crecimiento y la división celular (Levine, 1997).

Las funciones de la proteína p53 han sido intensamente estudiadas durante los últimos años.



Los genes de la familia *ras*, de los tumores al citoesqueleto y las vesículas secretorias

Los genes de la familia *ras* codifican proteínas pequeñas que pertenecen a la gran superfamilia Ras, la cual incluye las familias Ras, Rho/Rac, Rab, y más recientemente, las familias Arf y Ran. Todos los miembros de estas fa-

Tabla 21-3. Los genes supresores alterados en el cáncer humano.

Gen	*Locus* cromosómico	Principal(es) neoplasia(s) asociada(s)
APC	5q21	Carcinoma colorrectal
BRCA1	17q21	Cáncer de mama familiar
BRCA2	13q12-13	Cáncer de mama y de ovario
DCC	18q21	Cáncer colorrectal
DPC4	18q21.1	Carcinoma pancreático
E-cadherina	16q22.1	Cáncer de mama, endometrio, ovario y otros
INK4/MTS1/CDK41	9p21	Muchos tipos de tumores
INK4B/MTS2	9p21	Cáncer de pulmón de células no-pequeñas
MCC	5q21	Cáncer de colon
MLH1	3p21.3-p23	Cáncer de colon hereditario no-polipósico (HNPCC)
MLH2	2p22-p21	Cáncer de colon hereditario no-polipósico (HNPCC)
NF1	17q11.2	Neurofibromatosis tipo1
NF2	22q12	Neurofibromatosis tipo2
P53	17p13.1	Sarcoma, gliomas y carcinomas
PHB	17q21	Carcinoma de mama
PTC	9p22.3	Síndrome de carcinoma de células basales nevoides (NBCCS)
RB1	13q14	Retinoblastoma, sarcosomas y carcinomas
TGFBR1	9q33-q34	Carcinoma prostático y de colon
TGFBR2	3q21	Carcinoma de colon, cáncer de cabeza y cuello
VHL	3p25-p26	Enfermedad de Von Hippel-Lindau
WAF1	6p21	Cáncer de próstata
WT1	11p13	Tumor de Wilms

milias codifican proteínas pequeñas, de cerca de 21,000 Da y con actividad de GTPasa (Boguski y McCormick, 1993).

Como se mencionó anteriormente, los genes *ras* fueron descritos originalmente como los oncogenes transducidos por diversas cepas de retrovirus, entre ellas las de Harvey, Rasheed y Balb-c (Ha-*ras*) y la de Kirsten (Ki-*ras*). Estos oncogenes son capaces de generar sarcomas en ratas y fueron "adquiridos" de manera natural por cepas lentas de retrovirus que originalmente producían leucemias en ratones a largo plazo.

Los genes *ras* humanos fueron redescubiertos posteriormente cuando varios grupos de investigación pusieron en evidencia, de manera casi simultánea, la existencia de oncogenes similares a los de las cepas mencionadas de retrovirus en los tumores humanos. Varios grupos encontraron genes equivalentes a los presentes en las cepas de Harvey y Kirsten y, por ello, los nombres que se les asignaron fueron Ha-*ras* y Ki-*ras*. En el caso de N-*ras*, no se conoce hasta ahora una contraparte viral y su nombre lo adquirió debido a que fue encontrado originalmente en un neuroblastoma humano.

Es muy interesante hacer notar nuevamente que las cepas virales de Harvey y Kirsten se originaron durante el pasaje de los retrovirus en animales; es decir, los retrovirus originales no contenían los oncogenes (eran cepas de retrovirus lentos) que en el caso de la cepa de Harvey producían leucemias en ratones y que, después de su inoculación en ratas (las cuales se infectaban para producir las cepas virales), se obtuvo una cepa capaz de producir sarcomas de manera rápida; de ahí el nombre de estos oncogenes (*rat* sarcoma).

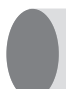
Los oncogenes *ras* son hasta ahora los oncogenes celulares que más frecuentemente se han encontrado alterados en los tumores sólidos de los humanos.

Los oncogenes *ras* son hasta ahora los oncogenes celulares que más frecuentemente se han encontrado alterados en los tumores sólidos de los humanos. Se piensa que entre 15 y 25% de todos los tumores humanos llevan en su origen alteraciones en unos de los tres genes *ras* (Ha-, Ki- y N-), generalmente, en forma de una mutación puntual. Los tumores humanos donde más frecuentemente se han encontrado alterados los oncogenes *ras* incluyen los adenocarcinomas de páncreas, de pulmón y de colon, así como los tumores de tiroides (Barbacid, 1987).

A pesar de que la secuencia de nucleótidos de los genes *ras* no está muy conservada entre distintas especies, su secuencia de aminoácidos presenta una conservación extraordinaria, al grado de que, por ejemplo, la proteína Ha-*ras* humana y la de ratón son idénticas en sus 196 aminoácidos (Lowy y Willumsen, 1993).

Las proteínas Ras participan en la transducción de señales de múltiples procesos que involucran diversos factores de crecimiento, hormonas y agentes que llevan a la diferenciación de ciertos tipos celulares.

Las proteínas Ras participan en la transducción de señales de múltiples procesos que involucran diversos factores de crecimiento, hormonas y agentes que llevan a la diferenciación de ciertos tipos celulares (figura 21-3).



¿Oncogenes?, ¿genes supresores?; la historia de algunos desertores

Los múltiples e inumerables estudios acerca de la función de los genes que participan en el desarrollo de tumores han llevado a su clasificación en dos grandes grupos, los *oncogenes*, de naturaleza dominante, y los *genes supresores de tumores*, de naturaleza recesiva. En el caso de los oncogenes, las

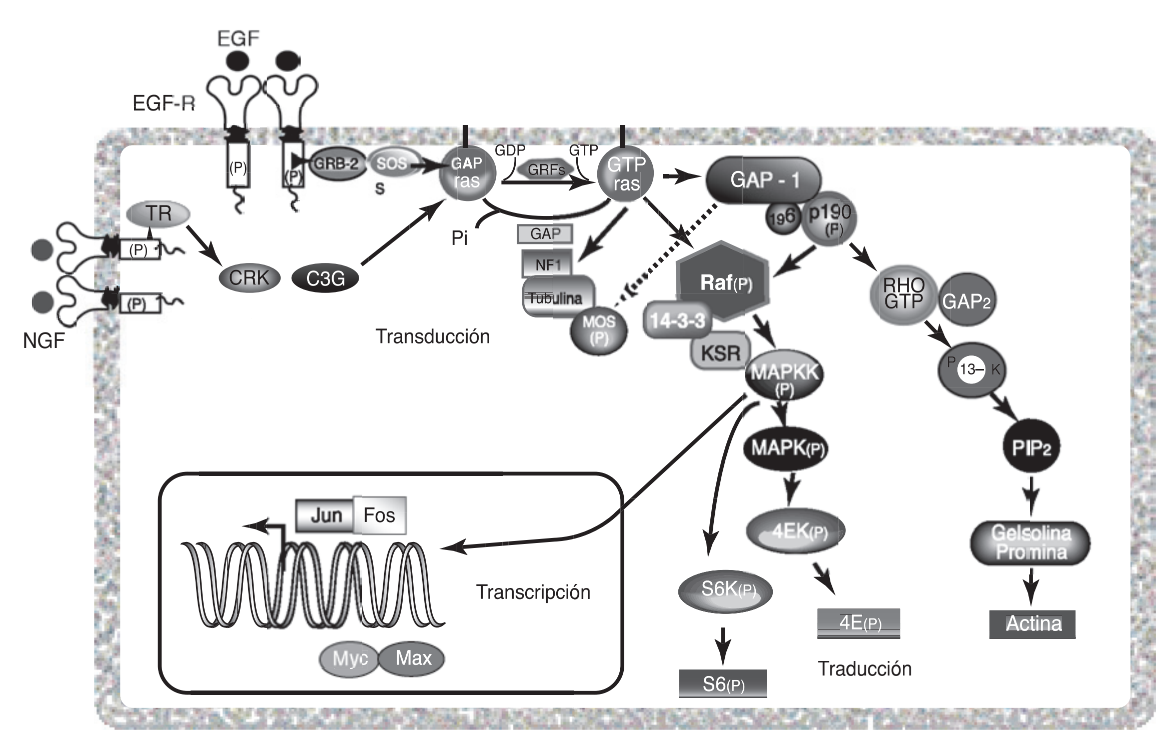


Figura 21-3. Vía de señalización de Ras, mostrando algunas de sus rutas más importantes así como sus integrantes.

alteraciones que éstos sufren los activan, mientras que, en el segundo caso, resultan en la pérdida de su función.

Los oncogenes transforman por una ganancia de función; los genes supresores lo hacen por la pérdida de ésta.

Es decir, mientras que los oncogenes transforman por una ganancia de función, los genes supresores lo hacen por la pérdida de ésta. Ahora bien, esta situación no siempre parece ser tan clara, e incluso resulta ambigua en el caso de algunos miembros prominentes de estas familias, como ha sido descrito recientemente para el gen E2F-1. Más aún, el futuro resulta incierto en el caso de otros miembros destacados de la familia de los oncogenes, pues son cada día más los ejemplos que nos indican que estos conceptos pueden conducirnos en direcciones equivocadas (Weinberg, 1996).

El caso más evidente de genes que han cambiado de grupo lo representa p53, clasificado originalmente dentro de la familia de los oncogenes y que, justamente ahora, representa el prototipo de los genes supresores de tumores. En su origen, la primera clona de p53 aislada mostró ser capaz de generar alteraciones en el crecimiento de células en cultivo y no fue hasta que se tuvo una clona de otro organismo, cuando se pudo apreciar que este gen no sólo no era capaz de transformar esas células, sino que, sorprendentemente, era capaz de revertir el fenotipo transformado de células que acarreaban alguna forma muy particular del gen p53.

Recientemente, otros miembros prominentes de la familia de oncogenes, como abl, junD y E2F, han sido descritos también como genes supresores de tumores, debido al papel que desempeñan en el control del ciclo celular y la proliferación. Es decir, la naturaleza dominante de los oncoge-

nes puede resultar engañosa, pues es posible ahora pensar en la existencia de mutaciones que, al mismo tiempo que causan la pérdida de una función, provocarían la aparición de características que harían que el nuevo producto ganara capacidades y, por lo tanto, lo harían aparecer como dominante.



Los virus tumorales de DNA acarrean oncogenes cuyos productos alteran el crecimiento normal de las células

Hace muchos años, quedó de manifiesto el hecho que algunos genes de ciertos miembros cercanos de la familia Papova, los poliomavirus y el virus SV40, son capaces de alterar de manera dramática el comportamiento de las células normales. Es decir, la introducción de pocos, e incluso uno, de los genes de estos virus de DNA puede afectar a una célula normal y transformarla. Estos hallazgos permitieron establecer sistemas *in vitro,* en cultivos establecidos de células, que permitieron definir los distintos procesos asociados a la transformación maligna. Uno de ellos, el ahora descrito como inmortalización, corresponde a la pérdida del control sobre el ciclo celular que resulta en la adquisición de una capacidad ilimitada para dividirse, sin alcanzar el límite característico de todas las células normales.

Ahora entendemos las bases moleculares de algunos de los procesos que resultan de la introducción de los genes transformantes de estos virus dentro de una célula normal. Por ejemplo, conocemos que el llamado antígeno T (del virus SV40) interactúa con varias proteínas celulares y, de esta forma, logra producir los cambios que resultan en la transformación celular. En particular, el antígeno T es capaz de interactuar con dos proteínas productos de genes supresores de tumores, la proteína p53, y el producto del gen del retinoblastoma (Rb). Ambos son elementos claves en el control del ciclo celular y en la respuesta celular ante daños al material genético, en particular en relación con el ciclo celular.

Más recientemente, otros virus de DNA, notablemente los papilomavirus, los adenovirus y algunos miembros de los herpesvirus (en particular, el virus de Epstein-Bar; EBV), han sido y continúan siendo estudiados en gran detalle, pues contienen oncogenes virales capaces de alterar el crecimiento y diferenciación de las células. El conocimiento de los mecanismos que utilizan estos virus para inmortalizar diversos tipos celulares nos permite conocer mejor los distintos elementos celulares que participan en el control normal del crecimiento, la diferenciación, la muerte y el ciclo celular (Weinberg, 1997).



Las mutaciones en algunos genes predisponen al cáncer

Desde hace mucho tiempo, ha sido evidente la existencia de síndromes que predisponen al cáncer en los humanos. La existencia de algunas familias, con una incidencia mucho mayor que la normal para desarrollar ciertos tipos de neoplasias, o donde algunos de sus miembros tienen una elevada

probabilidad, e incluso la certeza, de desarrollar en ocasiones un solo tipo de tumores, sugiere fuertemente la existencia de factores genéticos en el origen de estos padecimientos.

De hecho, algunos padecimientos autosómicos recesivos, como el de la anemia de Fanconi, la ataxia telangiectásica, la xerodermia pigmentosa y el síndrome de Bloom, representan alteraciones en genes cuyos productos constituyen verdaderas defensas normales de nuestras células contra mutaciones y cuyas alteraciones resultan inevitablemente en la aparición de tumores en aquellos individuos que los portan.

En este sentido, los ejemplos clásicos de retinoblastoma (Rb), de tumores de Wilms (WT), de algunos tumores endocrinos, así como los de pólipos y carcinomas del colon y la neurofibromatosis, todos parecen resultar de la herencia de rasgos autosómicos dominantes. Los portadores muestran una predisposición muy fuerte para desarrollar inevitablemente cierto tipo de tumores. En los casos anteriores, ahora resulta claro que la oncogénesis depende de mutaciones somáticas del segundo alelo, la copia normal, de estos genes y, por lo tanto, parecerían actuar de manera recesiva a nivel celular.



Referencias generales

Brugge, J.; Curran, T.; Harlow, E. y McCormick, F., *Origins of Human Cancer,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1991.

Cavanee, W.; Hastie N. y Stanbridge, E., "Recessive oncogenes and tumor suppression", *Current Communications in Molecular Biology,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Franks, L.M. y Teich, N.M., *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer,* 2a edición, Oxford Press, Oxford, R.U., 1991.

Weinberg, R.A., "How cancer arises", *Sci. Amer.* **275:** 62-70, 1996.

———, *Oncogenes and the molecular origins of cancer,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.



Referencias bibliográficas

Barbacid, M., "*ras* genes", *Annu. Rev. Biochem.,* **56:** 779-827, 1987.

Bishop, J.M., "Molecular Themes in Oncogenesis", *Cell,* **64:** 235-248, 1991.

Boguski, M.S. y McCormick, F., "Proteins regulating ras and its relatives", *Nature,* **366:** 643-654, 1993.

Kinzler, K.W. y Vogelstein, B., "Lessons from hereditary colorectal cancer", *Cell,* **87:** 159-170, 1996.

Levine, A.J., "The cellular gatekeeper for growth and division", *Cell,* **88:** 323-331, 1997.

——— "The tumor suppressor genes", *Annu. Rev. Biochem.,* **62:** 623-651, 1993.

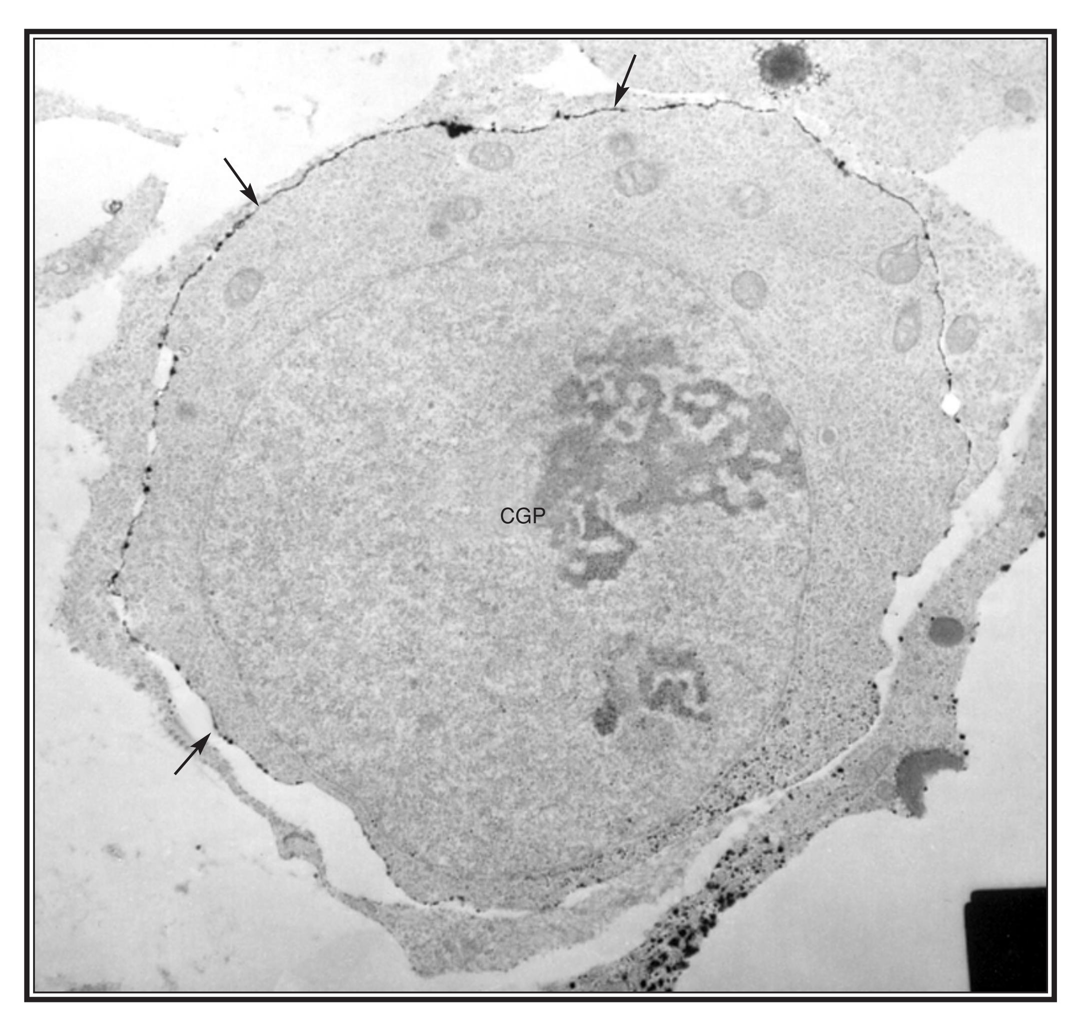
Lowy, D.R. y Willumsen, B.M., "Function and regulation of ras", *Annu. Rev. Biochem.,* **62:** 851-891, 1993.

Weinberg, R.A., "E2F and cell proliferation: a world turned upside down", *Cell,* **85:** 457-459, 1996.

———, "The cat and mouse games that genes, viruses and cells play", *Cell,* **88:** 573-575, 1997.

PARTE V

Interacciones celulares y diferenciación



Actividad de la fosfatasa alcalina en la membrana plasmática (flechas) de las células germinales primordiales (CGP) observada por microscopia electrónica.

CAPÍTULO 22

MADURACIÓN DE GAMETOS Y FERTILIZACIÓN EN MAMÍFEROS

Miguel Betancourt Rule ■ Edmundo Bonilla González
Eduardo Casas Hernández ■ Yvonne Ducolomb Ramírez



Introducción

Las células haploides que están especializadas para la reproducción sexual son denominadas gametos. Uno es grande e inmóvil, llamado ovocito, que es el gameto femenino; el otro es pequeño y móvil, el espermatozoide, que es el gameto masculino.

> Las células haploides que están especializadas para la reproducción sexual son denominadas gametos.

En los mamíferos el ovocito es una célula con un diámetro promedio de 100 µm. Su citoplasma contiene reservas nutritivas como lípidos, proteínas y polisacáridos. Se encuentra rodeado por una matriz extracelular, la zona pelúcida, formada principalmente por glicoproteínas. Esta cubierta lo protege de daños mecánicos y actúa como barrera especie-específica, admitiendo solamente espermatozoides de la misma especie. Además, contiene vesículas secretoras especializadas, adyacentes a la cara interna de la membrana citoplásmica, llamados gránulos corticales, con la función de liberar su contenido cuando son activados por el espermatozoide, con el fin de modificar la cubierta del ovocito para evitar que más de un espermatozoide se fusione con él (Alberts y cols., 1994) (figura 22-1a).

El espermatozoide en los mamíferos está compuesto de dos regiones principales: la cabeza y el flagelo, que se encuentran unidas entre sí por la pieza intermedia.

La cabeza contiene el acrosoma, el núcleo y residuos de algunas estructuras citoplásmicas. El acrosoma, que se encuentra en la parte anterior de la cabeza sobre el núcleo, está rodeado por una membrana y contiene enzimas hidrolíticas. Su núcleo contiene sólo un miembro de cada par cromosómico y, por lo tanto, es haploide. La cromatina está altamente condensada. El flagelo contiene un axonema central rodeado por fibras externas densas que se extienden desde la cabeza hasta el extremo posterior. La parte anterior del flagelo contiene las mitocondrias enrolladas alrededor de las fibras densas y la parte posterior de la cola contiene una vaina fibrosa que rodea a las fibras densas externas. Estas estructuras en conjunto forman el citoesqueleto del flagelo. Tanto el flagelo como la cabeza están cubiertos por la membrana plasmática que contiene un citoplasma escaso. Aunque los es-

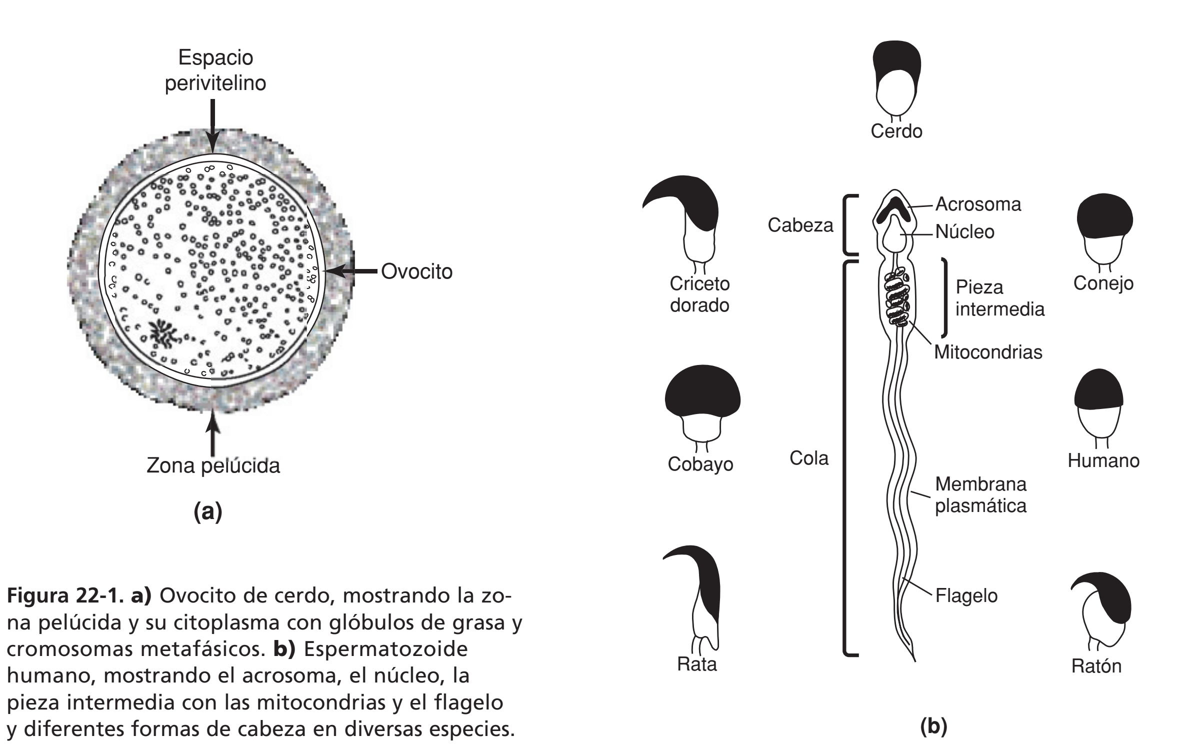


Figura 22-1. a) Ovocito de cerdo, mostrando la zona pelúcida y su citoplasma con glóbulos de grasa y cromosomas metafásicos. **b)** Espermatozoide humano, mostrando el acrosoma, el núcleo, la pieza intermedia con las mitocondrias y el flagelo y diferentes formas de cabeza en diversas especies.

permatozoides de los mamíferos tienen estas características generales, existen diferencias entre especies en cuanto a tamaño y forma de la cabeza y longitud y tamaño relativos del flagelo (Eddy y O'Brien, 1994) (figura 22-1b).



Espermatozoides

Maduración

Después de su formación en el testículo, los espermatozoides de los mamíferos pasan al epidídimo donde sufren cambios fisiólogicos, morfológicos y bioquímicos importantes que los preparan para el proceso de la fertilización, denominados maduración. El tránsito de los espermatozoides en este órgano es de aproximadamente dos semanas, aunque la maduración varía dependiendo de la especie.

Los fluidos recuperados de cada región del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) muestran diferencias importantes en cuanto a su composición bioquímica, por lo que los espermatozoides están sujetos a ambientes cambiantes a lo largo de su tránsito por él. En los últimos años, se ha estudiado con especial interés la importancia de las proteínas secretadas por este órgano en la fertilización (Parks y Hough, 1993).

Los efectos de las proteínas del epidídimo en la movilidad espermática ha sido demostrada en cricetos, donde se ha identificado una proteína, secretada por las células epiteliales de la cola del epidídimo, que al adsorberse a los espermatozoides poco móviles causa un cambio en el patrón

de su movimiento hacia una movilidad progresiva. En la rata, se ha determinado la participación de proteínas que intervienen en la movilidad espermática.

Algunas proteínas epididimarias tienen un efecto en la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida. En el cerdo, los espermatozoides obtenidos de la cabeza del epidídimo, a diferencia de los de las regiones del cuerpo y los de la cola, no pueden unirse a la zona pelúcida. En esta especie se han aislado tres proteínas de la cabeza epididimaria, con pesos moleculares de 30, 45 y 70 kDa, que, al unirse a espermatozoides maduros, bloquean su unión a la zona pelúcida *in vitro*. Además, se han descrito las "espermadhesinas", que son proteínas con afinidad por las del espermatozoide y de la zona pelúcida, por lo que pueden participar en la unión entre los gametos masculino y femenino, así como las "antiaglutininas" con peso molecular de 250 kDa, que, como su nombre lo indica, previenen la aglutinación de los espermatozoides. En el humano se ha encontrado una proteína de origen epididimario de 94 kDa, denominada FBL1, que se une a la región subacrosomal del espermatozoide y participa en la unión al ovocito (Boue y cols., 1995).

Durante la maduración epididimaria también se han notificado cambios en la membrana plasmática, entre los que se encuentran modificaciones en la composición lipídica, en la distribución de proteínas intramembranales y en los niveles de glicosilación. Sin embargo, aún se desconoce cuáles de estas modificaciones están relacionadas con la adquisición de la función fertilizante de los espermatozoides. De la misma manera, los mecanismos que inducen estas alteraciones a nivel de superficie del espermatozoide no han sido elucidados (Runnebaum y cols., 1995).

Una de las funciones principales del epidídimo es la secreción de proteínas denominadas factores estabilizantes del acrosoma, o "factores descapacitantes". Estos factores evitan que los espermatozoides desarrollen la reacción acrosomal durante su estancia y paso por el tracto reproductor masculino, desde su formación en el testículo hasta su eyaculación. Una vez que el semen se deposita en la vagina o útero, estos factores son removidos al nadar los espermatozoides a través del moco y son inactivados por digestión enzimática para permitir que los espermatozoides puedan llevar a cabo la reacción acrosomal y, por tanto, puedan fertilizar al ovocito. Los diferentes factores descapacitantes, así como su mecanismo de acción, se describirán más adelante (Bonilla y cols., 1996).

Capacitación

Los espermatozoides de varias especies de mamíferos no pueden fertilizar a los ovocitos inmediatamente después de ser eyaculados, sino que adquieren esta capacidad sólo después de permanecer cierto tiempo en el tracto reproductor de la hembra. Los cambios morfológicos y bioquímicos que hacen a los espermatozoides capaces de desarrollar la reacción acrosomal y fertilizar, son llamados colectivamente "capacitación".

Los cambios morfológicos y bioquímicos que hacen a los espermatozoides capaces de desarrollar la reacción acrosomal y fertilizar, son llamados colectivamente "capacitación".

La capacitación normalmente ocurre en el tracto reproductor de la hembra, lo que dificulta su estudio *in vivo*. Se han desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo celulares que permiten la capacitación de espermatozoides *in vitro*. Éstos son diferentes para las diversas especies de mamíferos, pero la mayoría de éstos se preparan con diferentes cationes (Na^+, K^+, Ca^{+2} y Mg^{+2}), aniones (Cl^-, HCO_3^- y $PO_4^=$), sustratos que aportan energía como lactato y piruvato y con albúmina sérica de bovino. Estos componentes se encuentran normalmente en el fluido del oviducto y actúan en conjunto, ya que ninguno de éstos en forma aislada tiene un efecto capacitante.

Durante la capacitación, los espermatozoides adquieren la capacidad de: 1) desarrollar una movilidad vigorosa ("hiperactivación"); 2) liberar sus contenidos acrosomales por exocitosis (reacción acrosomal) para poder penetrar la zona pelúcida, y finalmente, 3) fusionarse con la membrana citoplásmica del ovocito y de fertilizarlo (figura 22-2) (Yanagimachi, 1994).

Con el desarrollo de la capacitación y de la fertilización *in vitro*, se han logrado avances importantes en la comprensión de este proceso.

Participación del calcio

Los iones de calcio libre desempeñan un papel central tanto en la hiperactivación que adquieren los espermatozoides capacitados, como en el desarrollo de la reacción acrosomal. En todas las especies de mamíferos estudiadas (ratón, humano, criceto y cerdo), se requiere calcio extracelular en concentraciones milimolares durante la capacitación para adquirir la hiperactivación y para llevar a cabo la reacción acrosomal (Lievano y cols., 1996).

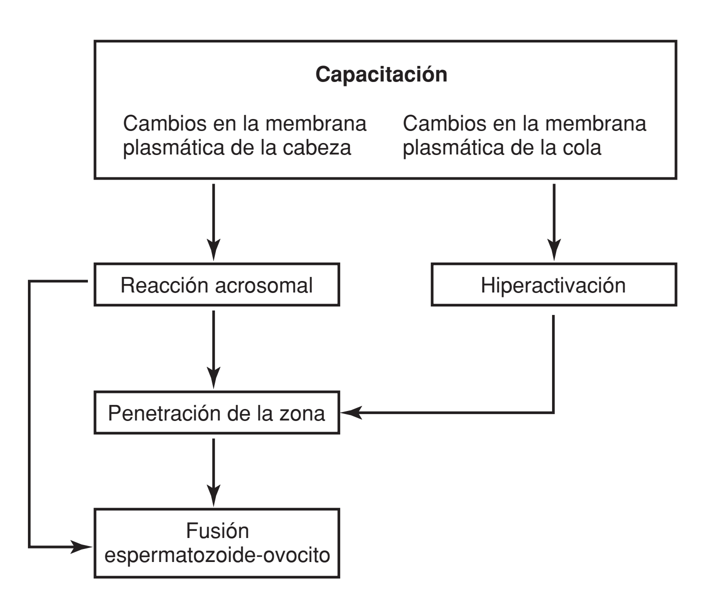


Figura 22-2. Procesos que ocurren como resultado de la capacitación espermática.

En espermatozoides de carnero, se ha planteado que el incremento de calcio libre citosólico en el espermatozoide después de su unión a la zona pelúcida, activa a las fosfolipasas-C específicas para polifosfoinosítidos (denominadas fosfoinositidasas-C), presentes en la membrana plasmática del espermatozoide, las cuales metabolizan a los polifosfoinosítidos hasta diacilglicerol (DAG) e inositol-fosfato. El DAG generado de esta manera activa a la fosfolipasa-A2 (y quizá, a la proteín-cinasa C) que metaboliza fosfolípidos a lisofosfolípidos y ácidos grasos libres (entre éstos, ácido araquidónico), que pueden causar la fusión de la membrana citoplásmica del espermatozoide con la membrana del acrosoma, originando la reacción acrosomal.

Participación del colesterol

El colesterol limita la inserción de proteínas en las bicapas de fosfolípidos, restringe la movilidad lateral de las proteínas membranales y modula la actividad de algunas de ellas cambiando su conformación. En varias especies, durante la capacitación espermática, disminuye la concentración de colesterol en la región de la membrana plasmática que recubre al acrosoma. La albúmina sérica presente en los fluidos del tracto reproductor de la hembra sirve como aceptor de esteroles, promoviendo la remoción de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide. Además, se ha determinado que la adición de colesterol causa una descapacitación reversible de los espermatozoides de ratón, cobayo, toro y humano, lo cual apoya la idea de que la reducción de colesterol es un paso importante para su capacitación (Benoff y cols., 1993).

Participación del AMPc

Los nucleótidos cíclicos, particularmente el AMPc, son importantes para la capacitación. La adición de nucleótidos cíclicos puede acelerar el desarrollo de la reacción acrosomal, la hiperactivación y la capacidad fertilizante. Además, la concentración intracelular de AMPc aumenta durante la capacitación, lo cual refleja cambios en la actividad de la adenilato-ciclasa y de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, las enzimas responsables de la biosíntesis de AMPc a partir de ATP, y del rompimiento metabólico de AMPc hacia 5'AMP, respectivamente. Las mediciones en la actividad enzimática en espermatozoides capacitados *in vitro* han mostrado que existe un incremento significativo en la actividad de la adenilato ciclasa y un descenso en la actividad de la fosfodiesterasa.

> Los nucleótidos cíclicos, particularmente el AMPc, son importantes para la capacitación.

La principal acción del AMPc es la estimulación de las proteín-cinasas dependientes de AMPc (proteín-cinasas A). Se ha encontrado que un inhibidor de la proteín-cinasa A previene el desarrollo de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos capacitados, lo cual apoya la participación de esta enzima en la capacitación espermática (Yanagimachi, 1994).

Participación de los factores descapacitantes

La adición de plasma seminal a espermatozoides del conejo capacitados causa una inhibición de la fertilización. Si después se elimina el plasma seminal, los espermatozoides adquieren nuevamente su poder fertilizante, es decir, el proceso es reversible. Lo anteriormente expuesto es la base del concepto de que la capacitación se encuentra asociada a la remoción de macromoléculas o factores descapacitantes de la superficie del espermatozoide eyaculado. Estos factores se producen en el epidídimo y su importancia fisiológica es evitar que los espermatozoides desarrollen la reacción acrosomal prematuramente durante su estancia en este órgano, que es de unas dos semanas.

Se han aislado y caracterizado factores descapacitantes en varias especies de mamíferos. Un factor estabilizante del acrosoma (ASF, de 260 kDa) se origina en el epidídimo del conejo, el cual, como su nombre lo indica, bloquea la fertilización al evitar que los espermatozoides puedan desarrollar la reacción acrosomal. En el plasma seminal humano se ha encontrado un “factor antifertilidad” con un peso de 200 kDa, cuyo mecanismo de acción se desconoce, y además se ha aislado una glicoproteína de 74 kDa que inhibe la reacción acrosomal. En el ratón se ha caracterizado un factor descapacitante con un peso molecular de 40 kDa originado en el epidídimo, que al parecer impide la penetración del espermatozoide por un bloqueo en la reacción acrosomal. En cerdo se ha comunicado la existencia de un factor descapacitante con un peso molecular mayor de 100 kDa, de naturaleza proteínica (Bonilla y cols., 1996). El campo de estudio de los factores descapacitantes es amplio, dado que, al parecer, existe más de un factor descapacitante por especie.

Mecanismo de acción de los factores descapacitantes

Los factores descapacitantes pueden estar relacionados con un impedimento de la internalización de calcio extracelular, fundamental para el desarrollo de la reacción acrosomal. Los espermatozoides epididimarios de toro internalizan calcio rápidamente, mientras que los espermatozoides eyaculados no lo hacen, lo que sugiere que el contacto con el plasma seminal afecta su capacidad para capturar este ion. A partir del plasma seminal de toro, ratón o rata se ha aislado una proteína denominada caltrina que actúa como inhibidor de los canales del transporte de calcio y, por tanto, de la capacitación y de la reacción acrosomal espermática.

Hay evidencias de la existencia de varias proteínas del plasma seminal de bovinos (BSP), con pesos moleculares que varían entre 15 y 30 kDa, denominadas BSP-A1, -A2, -A3, y BSP-30 kDa, que se unen a la calmodulina, proteína localizada en la membrana plasmática del espermatozoide. Esta proteína es conocida por su participación en la regulación de varios procesos celulares de una manera calcio-dependiente y su presencia ha sido demostrada en espermatozoides de cobayo, cerdo, toro, criceto y conejo. Los autores plantean que la unión de las BSP a la calmodulina impide la internalización de calcio, afectando así el desarrollo de la reacción acrosomal.

Se ha aislado una proteína presente en el plasma seminal de carnero y de humano que, al parecer, estimula la actividad de una ATPasa de calcio, promoviendo la salida del ion. En este caso, la eliminación de estos factores descapacitantes puede llevar a un aumento en los niveles de calcio intracelular hasta un valor necesario para que pueda ocurrir la reacción acrosomal (Desnoyers y Manjunath, 1994).

Dada la importancia de los factores descapacitantes en los procesos de capacitación y fertilización, existe un gran interés en identificarlos y caracterizarlos bioquímicamente, lo que ayudará a esclarecer el fenómeno de la capacitación espermática en mamíferos.

Disparo de la reacción acrosomal

Una vez que el espermatozoide alcanza la zona pelúcida que rodea al ovocito, debe penetrarla para que las membranas plasmáticas de ambos gametos puedan entrar en contacto y fusionarse. Sin embargo, los mecanismos bioquímicos que causan el disparo de la reacción acrosomal no están del todo claros (figura 22-3).

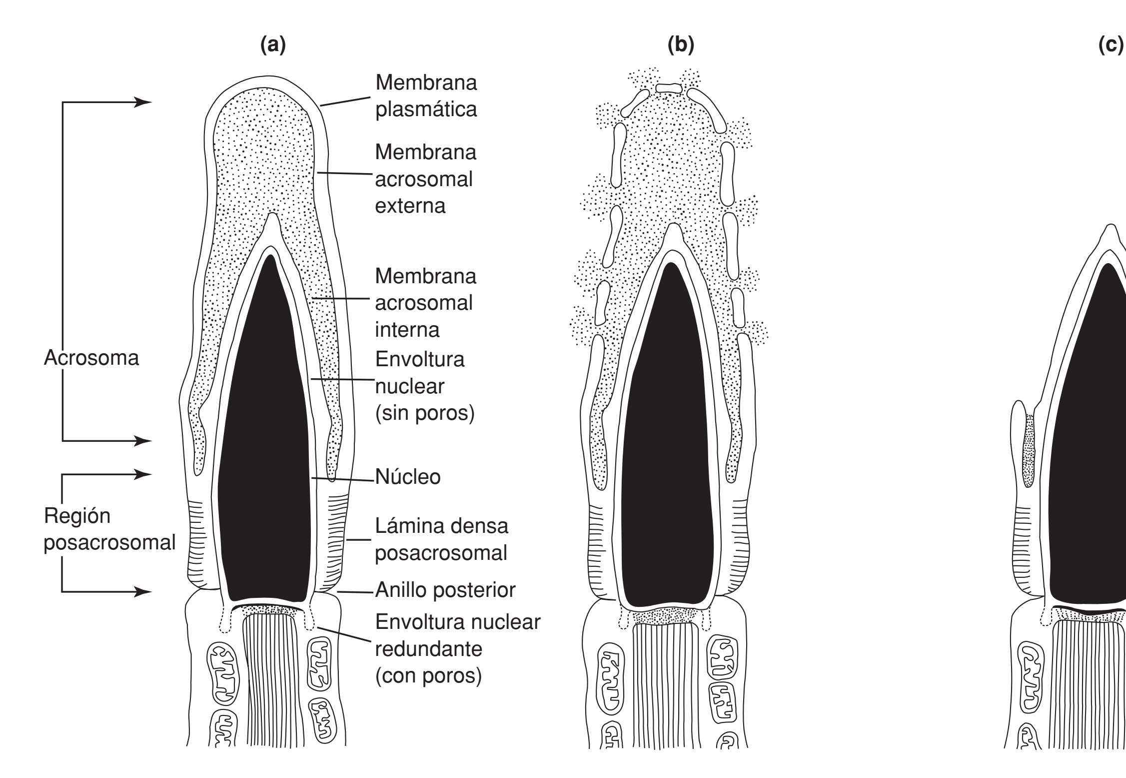


Figura 22-3. Diagrama que ilustra la progresión de la reacción acrosomal. **a)** Acrosoma intacto, antes de la reacción acrosomal. **b)** Inicio de la reacción. Se observan múltiples sitios de fusión entre las membranas plasmática y del acrosoma, que permiten la liberación de diversas enzimas. **c)** Reacción acrosomal terminada. La cara interna del acrosoma queda expuesta (modificada de Yanagimachi, 1994).

Hay evidencias que apoyan la existencia de dos sistemas de segundos mensajeros que, de manera conjunta o por separado, podrían ser responsables del disparo de la reacción acrosomal espermática. El primero de ellos se desencadena por la producción de AMPc y el segundo por la generación de inositol trifosfato y DAG.

Se plantea que la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito causa un incremento de calcio libre en el citoplasma del espermatozoide seguido por la activación de la adenilato-ciclasa por medio de una proteína G y un incremento en los niveles de AMPc, que a su vez resulta en una activación de proteincinasas dependientes de AMPc (proteincinasas A). Estas cinasas pueden finalmente activar por fosforilación a proteínas esenciales para el desarrollo de la reacción acrosomal. Se ha establecido que los niveles de AMPc aumentan considerablemente al inicio de la reacción acrosomal (Ahmad y cols., 1995; Dominguez y cols., 1995).

Una vez que el espermatozoide se une a la zona pelúcida del ovocito, y que ocurre un incremento en la concentración de calcio libre citosólico, se activan las fosfolipasas C, produciéndose DAG e inositol-fosfato. Esto da como resultado la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide, con la membrana del acrosoma, originando la reacción acrosomal (Roldan y cols., 1994; Yanagimachi, 1994).

También se han obtenido evidencias de que una tirosincinasa, de 95 kDa de la membrana del espermatozoide de ratón, puede mediar tanto la unión espermatozoide-ovocito, como el disparo de la reacción acrosomal. La actividad de esta enzima se estimula por la adición de zona pelúcida solubilizada y es inhibida por tirfostín, un inhibidor de tirosincinasas. Se plantea que la tirosincinasa podría activar la fosfolipasa C, de manera que estimularía la vía de los fosfoinosítidos (Leyton y cols., 1992).

Para tratar de establecer generalizaciones acerca de los mecanismos de transducción de señales que están relacionados con el disparo de la reacción acrosomal en mamíferos, se requieren estudios adicionales que incluyan un mayor número de especies.



Ovocitos

Ovogénesis

Inicio de la ovogénesis en los mamíferos

La gametogénesis en los mamíferos presenta características particulares según la especie y se produce por una combinación de divisiones mitóticas y meióticas. En las primeras se mantiene el número cromosómico diploide característico de la especie, mientras que a través de la meiosis este número es reducido a la mitad para producir los gametos con un número cromosómico haploide (Wassarman y Albertini, 1994).

En el caso de las hembras, las ovogonias (2n) se producen a partir de las células germinales primordiales durante las primeras etapas del desarrollo embrionario y posteriormente inician la proliferación mitótica para

convertirse en ovocitos primarios. En este punto se inicia la primera división meiótica y en la mayoría de los mamíferos queda detenida en el estadio de diploteno de la profase I durante toda la vida fetal y hasta que la hembra alcanza la pubertad. En la figura 22-4 se describe con detalle todo este proceso. Durante este largo periodo en profase I, el núcleo del ovocito es conocido como vesícula germinal y sus cromosomas en estado de diploteno difuso pueden inducir una transcripción activa que permite que los ovocitos primarios acumulen RNA mensajero que será requerido durante su desarrollo posterior. En este lapso, el crecimiento del ovocito depende de que

La primera división meiótica en la mayoría de los mamíferos queda detenida en el estadio de diploteno de la profase I durante toda la vida fetal y hasta que la hembra alcanza la pubertad.

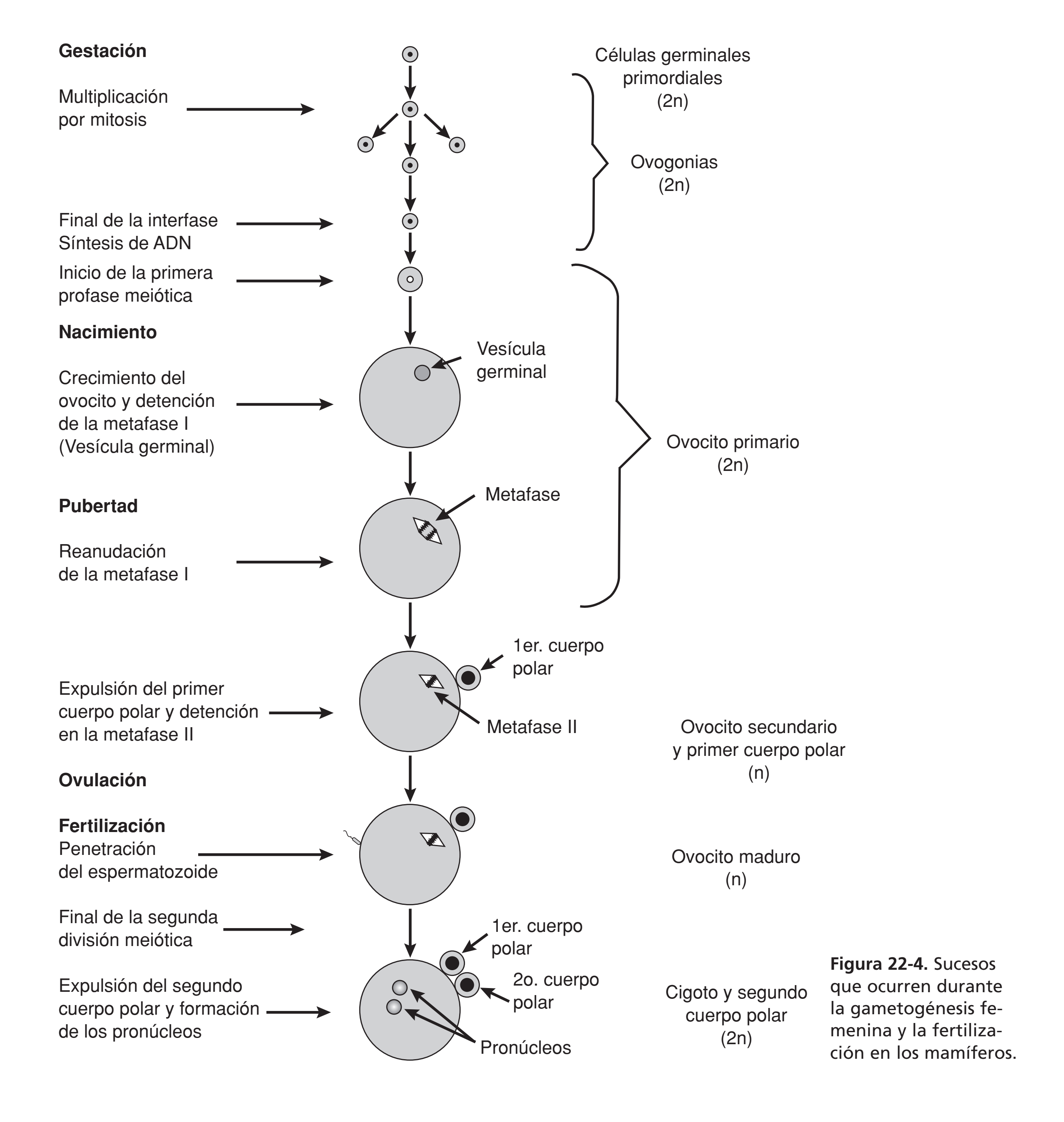


Figura 22-4. Sucesos que ocurren durante la gametogénesis femenina y la fertilización en los mamíferos.

sean mantenidas las uniones comunicantes entre el ovocito y las células de la granulosa. Diversos estudios indican que éstas son también las responsables de mantener la detención del ovocito en la etapa de profase I (Eppig, 1993).

Las células foliculares y su papel durante la gametogénesis

Los folículos primordiales de los ovarios de los mamíferos están constituidos por un ovocito detenido en la profase de la primera división meiótica y una capa aplanada de células foliculares en contacto íntimo con el primero. Las células foliculares emiten proyecciones citoplásmicas hacia el ovocito y establecen uniones comunicantes con él. Al final del periodo de crecimiento folicular, el ovocito detiene su crecimiento y permanece rodeado de células foliculares asociadas muy de cerca a él, conocidas a partir de este momento como células del cúmulo o *cumulus oophorus*, formando el complejo ovocito-células foliculares.

El contacto físico y la comunicación intercelular entre las células germinales y somáticas en este complejo parecen ser necesarias para la supervivencia del ovocito y su desarrollo, ya que a través de las uniones comunicantes se transfieren sustancias de bajo peso molecular, principalmente nutrientes como el piruvato y precursores metabólicos como aminoácidos y nucleótidos. Estas sustancias le permiten crecer, concluir con la primera división meiótica y adquirir la capacidad para ser fertilizado exitosamente después de la ovulación. Después de que se produce un incremento en los niveles de hormona luteinizante, que es la señal hormonal que induce la ovulación, las uniones intercelulares se interrumpen por la producción de ácido hialurónico por parte de las células cúmulo que ocasiona una dispersión de ellas en una matriz viscosa. Aparentemente, el ovocito es responsable de secretar un factor que induce la expansión de las células del cúmulo.

Después de que las uniones se han roto, las células foliculares permanecen retenidas alrededor del ovocito durante el periodo preovulatorio y hasta después de la ovulación, lo que permite que factores que se difunden desde ellas hasta el ovocito induzcan las etapas finales de la maduración. Además, facilitan la captura del *cumulus oophorus* por las fimbrias del oviducto y la penetración del ovocito por los espermatozoides durante la fertilización (figura 22-5) (Hunter, 1991; Eppig, 1991).

Detención meiótica

Señales negativas que mantienen la detención en la primera profase meiótica

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la detención de la profase I. Los ovocitos de mamífero, a diferencia de los ovocitos de equinoder-

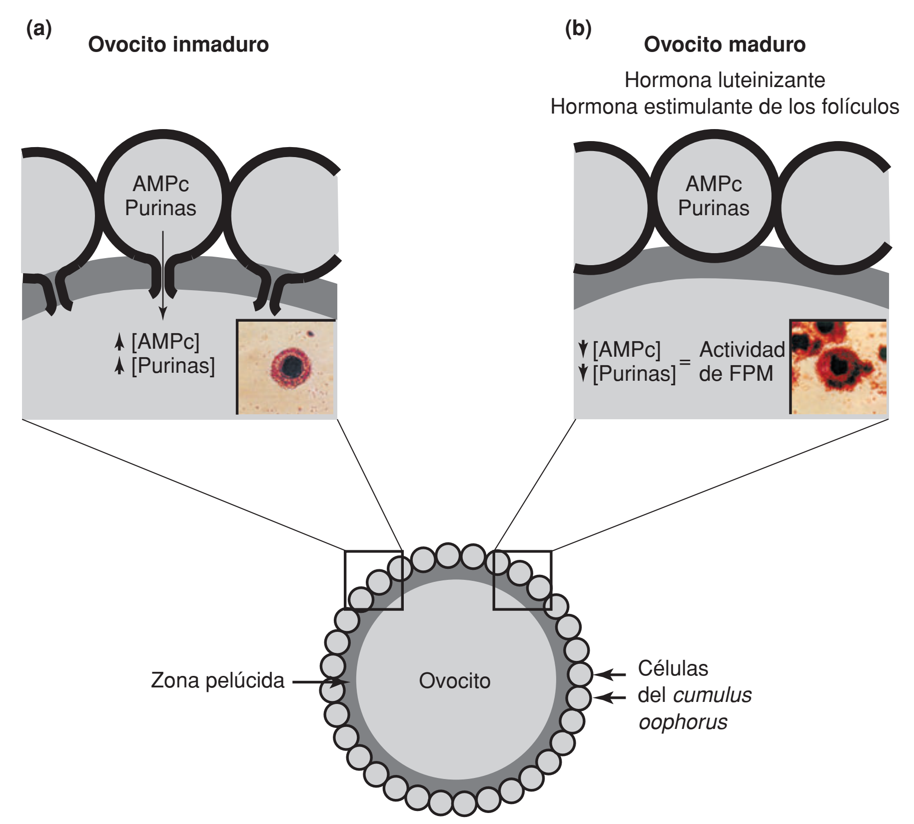


Figura 22-5. Aspecto de las uniones comunicantes entre el ovocito y las células del cúmulo en el proceso de maduración. **a)** Ovocito inmaduro con las uniones comunicantes intactas que permiten el paso de metabolitos entre ambas células. En el inserto se observa el *cumulus oophorus* muy compacto, característico de un ovocito inmaduro. **b)** Ovocito maduro, en el que las uniones se han roto por la dispersión de las células del cúmulo y se evita el paso de inhibidores de la maduración. En el inserto se observa el *cumulus oophorus* completamente expandido. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

mos y anfibios, tienen la capacidad de madurar espontáneamente cuando son liberados de los folículos y cultivados *in vitro*. Por esto, se propone que las células foliculares son las responsables de esta detención a través de la producción y liberación de moléculas específicas tales como AMPc o purinas como adenina e hipoxantina. Las señales inhibitorias provenientes de las células foliculares pueden ser transmitidas al ovocito a través del líquido folicular como sucede en el ratón, o por las uniones comunicantes como en la rata.

Los altos niveles de AMPc, suministrado principalmente por las células foliculares, permiten mantener la detención del ovocito en la profase I y sólo es liberado de este efecto inhibitorio cuando se interrumpe la comunicación a través de las uniones comunicantes y los niveles de AMPc disminuyen. Esta disminución inactiva a la proteincinasa dependiente de AMPc (PKA) y a través de una cascada de procesos desconocida; la inactivación de la PKA permite la activación de una fosfatasa que defosforila al factor promotor de la maduración. Sin embargo, en algunas especies (criceto y oveja)

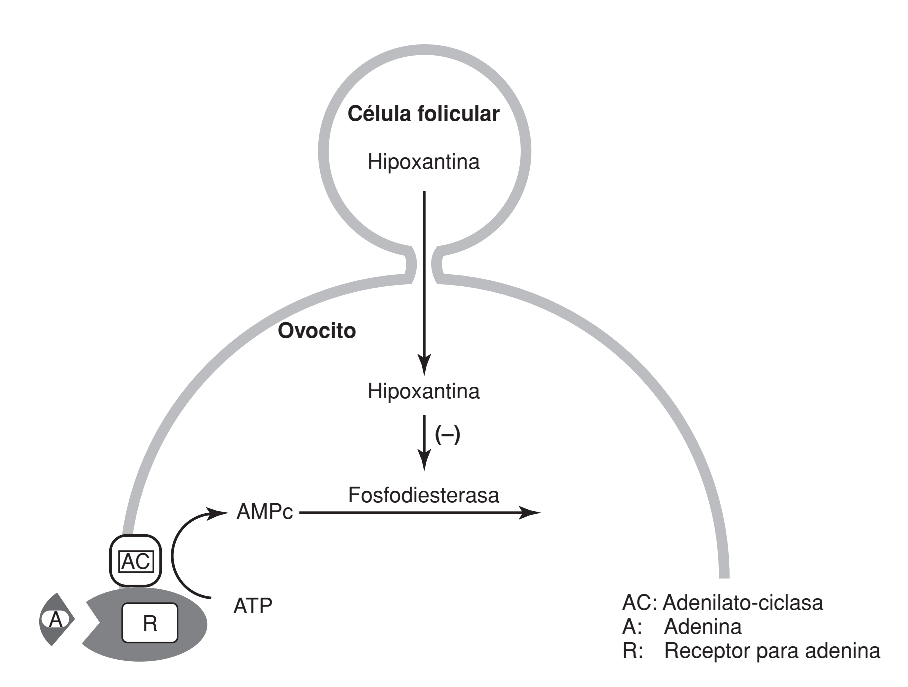


Figura 22-6. Efecto de las purinas en el ovocito que mantienen la cesación en la profase de la primera división meiótica.

no se ha detectado la disminución de los niveles de AMPc que preceden al rompimiento de la vesícula germinal y, en el caso específico del conejo y del cerdo, se ha mostrado que existe un incremento asociado a la maduración.

En el modelo propuesto para explicar la detención de la profase I por la acción de las purinas, se postula que la adenosina estimula a la adenilato-ciclasa del ovocito a través de un receptor de membrana, mientras que por otro lado la hipoxantina transferida desde las células foliculares por las uniones comunicantes previene la hidrólisis del AMPc, por la inhibición de la AMPc-fosfodiesterasa. En ambos casos el efecto observado es el mantenimiento de altos niveles de AMPc que impiden la reanudación de la meiosis (figura 22-6) (Lindner y cols., 1983).

Factor promotor de la maduración o de la fase M (FPM)

La maduración de los ovocitos requiere de la activación de un complejo proteínico heterodimérico conocido como factor promotor de la fase M o mitosis (FPM).

La liberación del ovocito de la detención de la primera división meiótica ha sido estudiada en especies tan diversas como anfibios, estrellas y erizos de mar, almejas y distintos mamíferos e, independientemente del sistema de señalización que inicia el rompimiento de la vesícula germinal, la maduración de los ovocitos requiere de la activación de un complejo proteínico heterodimérico conocido como factor promotor de la fase M o mitosis (FPM). El FPM, descrito originalmente en ovocitos de anfibios, es un complejo proteínico ampliamente conservado desde el punto de vista evolutivo, ya que se han encontrado formas muy similares desde levaduras hasta humanos, tanto en células germinales como somáticas. En ovocitos de mamífero, se ha determinado su presencia en distintas especies, como bovinos, ratones, cerdos y cabras (Norbury y Nurse, 1992).

Función del FPM en el ciclo celular

El FPM es un dímero formado por dos componentes. El primero es una proteína de 34 kDa, producto del gen *cdc2* en *Schizosaccharomyces pombe*, por lo que es conocida como $p34^{cdc2}$ y que tiene actividad de cinasa de serina/treonina, exhibiendo una importante preferencia por la histona H1 como sustrato. Es una proteína altamente conservada en los eucariontes. En todas las especies de protozoarios, plantas y animales analizadas a la fecha, se han encontrado genes homólogos de ella. Múltiples estudios han mostrado que la $p34^{cdc2}$ pertenece a una gran familia de cinasas dependientes de ciclinas o CDK, encargadas de fosforilar sustratos específicos en distintos momentos del ciclo celular. El segundo componente es la ciclina B, proteína con un peso molecular de 45 kDa y que tiene un patrón periódico de síntesis y degradación: se sintetiza durante la interfase, es degradada al final de la mitosis y se resintetiza durante la siguiente interfase, actuando como subunidad reguladora de la actividad del FPM. Se propone que se debe acumular una cantidad de ciclina B más allá de cierto umbral para que la célula entre en mitosis nuevamente.

Al inicio de la mitosis, el complejo se acumula principalmente en el núcleo y en los centrosomas. En el núcleo es capaz de fosforilar a la histona H1, láminas nucleares, nucleolinas y RNA-polimerasa, mientras que en el centrosoma hace lo mismo con las proteínas participantes en la polimerización de microtúbulos. La fosforilación de todas estas proteínas inicia los cambios que ocurren en la mitosis y se sabe que son inducidos por el FPM, entre los que se pueden mencionar cambios en la dinámica de los microtúbulos, incluidas la formación del huso mitótico, la condensación de los cromosomas, la inhibición de la fusión de vesículas y la desintegración de la envoltura nuclear y del sistema de endomembranas.

Aparentemente, el ciclo celular es conducido por una oscilación acoplada de la actividad de FPM y la concentración de la ciclina. En un sistema libre de células de ovocitos de *Xenopus,* que reproduce los procesos del ciclo celular, se ha mostrado que la síntesis de ciclina B es suficiente para llevar al inicio de la mitosis, mientras que su degradación es requerida para salir de esta fase del ciclo celular. En los mamíferos se han detectado cambios en la localización y concentración de la ciclina B asociados a distintos procesos del ciclo mitótico que sugieren su participación en la regulación del ciclo celular (Nigg, 1995).

Participación del FPM durante la división meiótica

El papel fundamental del FPM es desencadenar la transición de las células desde G2 hacia M en el ciclo celular, pero, como los cambios cíclicos en la activación del FPM son cruciales en la regulación del ciclo mitótico ordinario en las células somáticas, es muy probable que la maduración de los ovocitos involucre cambios cíclicos similares en la actividad del FPM. En la profase de la meiosis I, el DNA se ha replicado y es transcrito activamente, la envoltura nuclear está intacta y el huso mitótico no se ha formado, por

El papel fundamental del FPM es desencadenar la transición de las células desde G2 hacia M en el ciclo celular.

lo que se asemeja notablemente a la fase G2 de un ciclo de división mitótica ordinario.

Los ovocitos de ratón en fase de vesícula germinal no tienen una actividad detectable de FPM, pero ésta se incrementa al tiempo del rompimiento de la vesícula germinal (RVG) y alcanza su máximo en el estadio de metafase I. La actividad vuelve a disminuir al momento de la emisión del segundo cuerpo polar y de nuevo alcanza un nivel alto en la metafase II.

Al final de la primera división meiótica, la actividad del FPM decae, pero los cromosomas no se descondensan, ni los microtúbulos se rearreglan ni el núcleo se reforma, por lo que se sugiere la participación de otra cinasa diferente del FPM para este suceso. Los candidatos más viables para ello son las cinasas activadas por mitógenos (MAP-cinasas), que son capaces de fosforilar a sustratos semejantes a los del FPM y que evitan que el ovocito entre en una interfase entre las meiosis I y II (figura 22-7). Como estas cinasas son activadas después de la activación de $p34^{cdc2}$, se propone que se encuentren colocadas por debajo del FPM en la cascada de cinasas responsables de la división celular, además de la posibilidad de que, a semejanza de lo que ocurre con los anfibios, en los mamíferos una señal común sea capaz de activar a ambos tipos de cinasas de forma paralela.

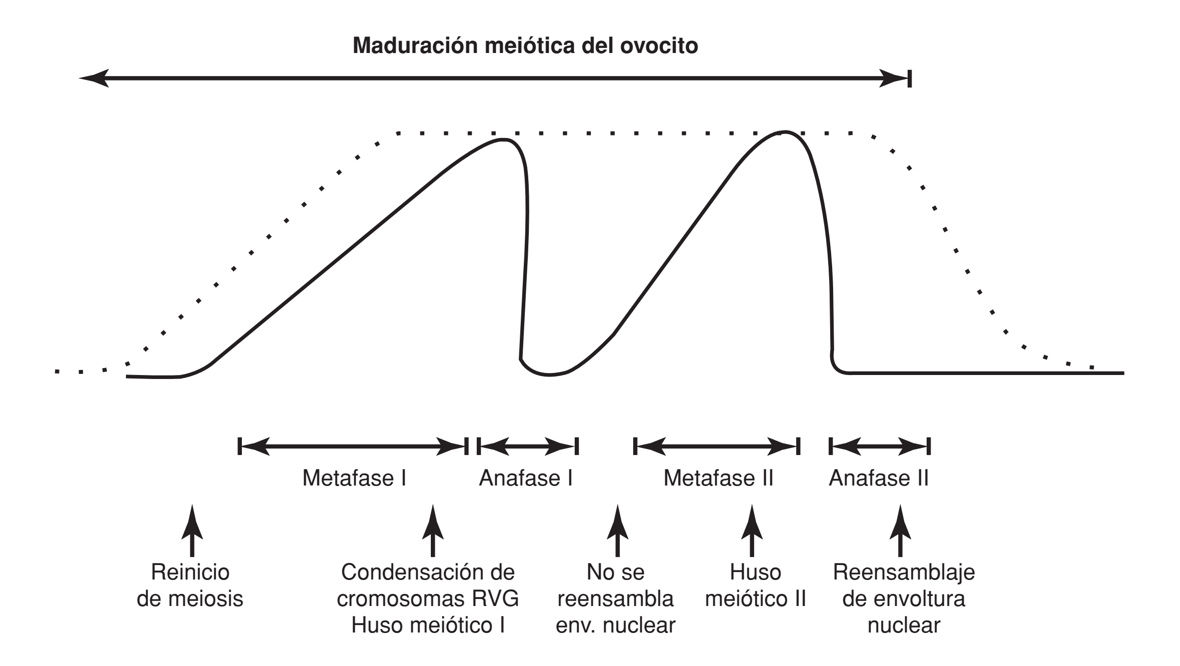


Figura 22-7. Modelo de la participación de diversas cinasas durante la meiosis. Se evita el retorno de la célula a la interfase por la participación sincronizada de MAP-cinasa y FPM. Así mismo, se muestran las oscilaciones en la concentración de FPM sincronizadas con los procesos de la meiosis.

Al término del rearreglo celular que produce la mitosis (citoesqueleto, condensación de cromosomas, etc.), el FPM activa el sistema de degradación de la ciclina B. El ovocito en este momento ya ha sufrido la desaparición de la vesícula germinal y la expulsión del primer cuerpo polar, signos que indican una maduración nuclear del ovocito (Dekel, 1995).

Terminación de la meiosis y maduración del ovocito

Maduración del ovocito

Al inicio de la pubertad, la liberación de la hormona estimulante de los folículos induce la maduración de algunos de los folículos que contienen a los ovocitos primarios. Al término del crecimiento folicular, la ovulación se produce por la acción de la hormona luteinizante sobre las células foliculares, que, por mecanismos parcialmente conocidos, liberan al ovocito de la detención en profase I y le permiten continuar a través del resto de la meiosis hasta alcanzar la metafase II sin una interfase intermedia. El avance del ovocito desde el estado de diploteno hasta la metafase de la segunda división meiótica se conoce como maduración meiótica y se caracteriza por el rompimiento de la vesícula germinal, la condensación de la cromatina en cromosomas bivalentes, la segregación de los cromosomas homólogos y la formación del primer cuerpo polar. Después de esto, la meiosis queda detenida nuevamente con los cromosomas alineados en el huso de la segunda metafase.

La ovulación se produce por la acción de la hormona luteinizante sobre las células foliculares.

En el curso de la maduración ocurren también los procesos citoplásmicos esenciales para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. Al término de la maduración, el folículo se rompe, el ovocito es liberado y, después de la ovulación, la unión con el espermatozoide desencadena el proceso de activación metabólica del ovocito que conduce a la terminación de la segunda división meiótica con la expulsión del segundo cuerpo polar (McGaughey, 1978) (figura 22-4).

Efecto hormonal sobre la maduración del ovocito

En estudios *in vitro* se ha logrado la maduración de ovocitos mediante el empleo de distintos medios de cultivo suplementados con suero o adicionados de hormonas, principalmente hormona luteinizante, hormona estimulante de los folículos y estradiol. Los ovocitos completan la primera división meiótica y quedan detenidos en metafase II, a semejanza de lo que ocurre con el desarrollo del ovocito *in vivo*, indicando que estas hormonas deben ser las responsables de la señal de maduración de los ovocitos primarios. Sin embargo, el ovocito carece de receptores para estas hormonas, por lo que su mecanismo de acción debe estar mediado por las células foliculares que rodean al ovocito.

El incremento preovulatorio de hormona luteinizante induce el rompimiento de la vesícula germinal *in vivo*, mientras que en cultivo lo hace

sólo en ovocitos rodeados de células de la granulosa, por lo que es probable que la hormona luteinizante induzca el rompimiento de la vesícula germinal por un mecanismo indirecto mediado por las células foliculares. En anfibios, la maduración es inducida por la progesterona secretada por las células foliculares circundantes, en respuesta a la acción de la hormona luteinizante sobre ellas. En los mamíferos, la maduración ocurre aparentemente por el desmantelamiento de las uniones comunicantes entre ovocito y células foliculares, que interrumpe el flujo de las sustancias responsables de la detención de la meiosis.

En el caso de la hormona estimulante de los folículos, además de su participación en el crecimiento folicular *in vivo*, esta hormona estimula a las células foliculares a producir y secretar ácido hialurónico que dispersa a las células cúmulo que circundan al ovocito, además de que se ha demostrado que es indispensable para la maduración citoplásmica del mismo.

Aunque se conoce poco acerca de los requerimientos de estradiol para la maduración *in vitro* de ovocitos de mamífero, algunos estudios indican que el estradiol y la 17-α-OH-progesterona parecen promover la maduración citoplásmica y el desarrollo normal del pronúcleo masculino.

Señales positivas para la inducción de la maduración

Algunos estudios proponen la producción de una señal positiva de inducción de rompimiento de la vesícula germinal como respuesta a la hormona luteinizante, más que por la sola interrupción de la comunicación intercelular. La señal inductora no ha sido reconocida aún, pero algunos trabajos apuntan a la participación de los iones Ca^{+2} en este fenómeno. El calcio actuaría por medio de una vía dependiente de calmodulina activando a la AMPc-fosfodiesterasa y disminuyendo la concentración de AMPc por debajo de los niveles necesarios para mantener la detención de la meiosis I e iniciar la cascada de procesos que finalmente conducen al rompimiento de la vesícula germinal.

En ovocitos de *Xenopus,* se propone también la participación de la proteín-cinasa C en la inducción de la maduración de los ovocitos, regulando negativamente a una fosfoproteína inhibidora de la meiosis. Esta cinasa se activa por la acción de DAG, como segundo mensajero producido en respuesta a la acción de la progesterona sobre la membrana del ovocito (Eppig, 1993).

Recientemente se ha caracterizado a un esterol (C29), purificado a partir de líquido folicular, que activa la meiosis *in vitro* en ratones, aun en ovocitos detenidos por hipoxantina y que se propone como la señal positiva que activa el reinicio de la meiosis. Sin embargo, se desconoce el posible mecanismo de acción de este factor.

Después de que el ovocito ha sido expulsado del ovario, sólo sobrevive si es fertilizado por un espermatozoide.



Fertilización

Después de que el ovocito ha sido expulsado del ovario, sólo sobrevive si es fertilizado por un espermatozoide, ya que de otra manera muere al igual

que los espermatozoides que no lo fecundan. Cuando estas dos células se fusionan, se lleva a cabo el proceso de la fertilización, formando un cigoto a partir del cual se desarrollará un nuevo organismo (Alberts y cols., 1994).

Aunque este proceso tan importante en la reproducción sexual de los organismos fue descrito desde hace más de cien años, varios de los pasos de este complejo proceso aún están en estudio. En años recientes, los avances en este campo son debidos principalmente a las técnicas como la microscopia electrónica, la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, las técnicas de biología molecular y el sistema de fertilización *in vitro* (Betancourt y cols., 1993).

Interacción de gametos

En esta sección se describen los diferentes obstáculos que tiene que sortear el espermatozoide para interactuar con el ovocito y lograr la fertilización, ya que, de los 300 millones de espermatozoides que son eyaculados por el hombre, aproximadamente sólo 200 llegan al oviducto, que es la estructura donde se lleva a cabo la fecundación. El ovocito se encuentra rodeado del *cumulus oophorus* que debe ser atravesado para que los espermatozoides lleguen a él, además deben entrar en contacto con la zona pelúcida, pasar a través de ella y finalmente penetrar en el ovocito.

De los 300 millones de espermatozoides que son eyaculados por el hombre, aproximadamente sólo 200 llegan al oviducto, que es la estructura donde se lleva a cabo la fecundación.

Interacción entre espermatozoides y cumulus oophorus

La matriz del *cumulus oophorus* está constituida principalmente por ácido hialurónico polimerizado con un peso molecular de 2,500 kDa, a su vez conjugado con diversas proteínas, lo cual le confiere una estructura muy resistente. Esta matriz es secretada por las células del cúmulo al inicio de la meiosis, produciendo una expansión de ellas antes de la ovulación, para permitir el posterior paso de los espermatozoides a través de ellas. Al obtener por punción los ovocitos foliculares *in vitro*, éstos deben incubarse de 24 a 48 horas en presencia de las hormonas luteinizante y estimulante de los folículos hasta que la capa de células se expanda completamente, siendo esta característica una indicación de que el ovocito ha madurado. Con este tratamiento se puede alcanzar hasta 90% de maduración en el laboratorio. *In vivo* la dispersión de las células del cúmulo se produce hasta después de la fertilización.

Es común ver en los textos, fotografías en las que varios o numerosos espermatozoides están rodeando a la zona pelúcida o en contacto con ella. Sin embargo, esto sólo sucede *in vitro* en condiciones de laboratorio, cuando es agregado un gran número de espermatozoides (figura 22-8), pero *in vivo*, en condiciones naturales, muy pocos espermatozoides están presentes cerca del ovocito durante la fertilización y en algunos casos llegan al extremo de estar en proporción 1:1. Esto se debe principalmente a que muy pocos espermatozoides atraviesan las células del cúmulo (Yanagimachi, 1994).

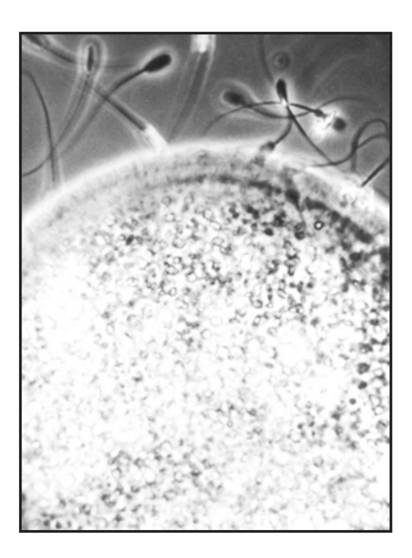


Figura 22-8. Fertilización *in vitro* de un ovocito de cerdo en donde se observa un gran número de espermatozoides rodeándolo (100X).

Otro aspecto muy impotante es que los espermatozoides deben estar capacitados para poder penetrar entre el *cumulus oophorus*, ya que si no lo están, sólo se unen a él, pero no lo pueden traspasar. Se ha demostrado que espermatozoides que han llevado a cabo la reacción acrosomal antes de penetrar a las células cúmulo, tampoco pueden penetrar a través de ellas. Los mecanismos del paso de los espermatozoides a través de esta estructura aún no son claros. Evidencias recientes indican que el acrosoma contiene diversas enzimas como la hialuronidasa y la acrosina, adquiridas durante la maduración en el epidídimo, que pueden ser las responsables de esta capacidad de penetración, pues la miocrisina y la heparina, inhibidores de la hialuronidasa, evitan la penetración de los espermatozoides. Además, el espermatozoide debe ejercer una fuerza mecánica considerable para lograr atravesar esta barrera celular.

En varias especies de mamíferos como ratones, cricetos, cerdos y bovinos, la presencia de células del cúmulo hacen más eficiente la fertilización *in vitro*, por lo que se supone que existen factores producidos por ellas para incrementar la movilidad espermática y promover la reacción acrosomal. Otras de sus posibles funciones son que el ovocito rodeado de las células del cúmulo ofrece un blanco más evidente para los espermatozoides, prolongan la vida fértil del ovocito, hacen más lento el proceso de endurecimiento de la zona pelúcida después de la ovulación, evitan que los espermatozoides con reacción acrosomal se alejen de la zona pelúcida y sirven de filtro para admitir sólo aquellos espermatozoides que son más vigorosos, descartando aquellos que tienen una movilidad inadecuada. Finalmente y dado que la matriz extracelular tiene íntima relación con la zona pelúcida, se ha propuesto que ésta mantiene fijo al ovocito durante la fertilización, permitiendo que los espermatozoides penetren la zona pelúcida con menos esfuerzo. Sean algunas o todas estas las funciones que se le atribuyen a las células del cúmulo, es claro que en conjunto permiten que se lleve a cabo una fertilización más eficiente (Yanagimachi, 1994).

Reconocimiento del espermatozoide con la zona pelúcida

Los ovocitos de los mamíferos sin excepción se encuentran rodeados por una matriz extracelular denominada zona pelúcida, que tiene funciones variadas y esenciales durante la fertlilización y el desarrollo temprano del embrión. Sus principales funciones son: el reconocimiento especie-específico del espermatozoide, la inducción de la reacción acrosomal, evitar la polispermia, evitar la disociación de los blastómeros y ayudar a la implantación del embrión en el útero (figura 22-9).

Los ovocitos de los mamíferos sin excepción se encuentran rodeados por una matriz extracelular denominada zona pelúcida.

Dada la importancia de esta estructura, durante los últimos años ha sido objeto de estudio en diferentes especies de mamíferos. Su grosor es muy variado, dependiendo de la especie, y puede medir desde 1 a 2 μm en los marsupiales hasta 16 μm en el cerdo. El material que constituye a la zona pelúcida se encuentra más densamente compactado en la mitad interna que en la externa. La superficie exterior muestra una estructura reticular de diversos tamaños semejando una esponja, mientras que su superficie interna tiene una apariencia más bien granular o de microtúbulos (figura 22-10) (Dunbar y cols., 1991).

La zona pelúcida está compuesta en un alto porcentaje de glicoproteínas. Por ejemplo, en cerdo, está constituida por 71% de proteínas y 19% de carbohidratos, principalmente monosacáridos como la fucosa, manosa, galactosa y ácido *N*-acetil-glucurónico, 2.7% de ácido siálico y 2.4% de sulfatos. Los complejos glicoproteínicos de la zona pelúcida tienen un núcleo peptídico con diversos carbohidratos que le confieren las características diferenciales entre sí, produciendo una extensa heterogeneidad en los componentes de la zona pelúcida (Dunbar y cols., 1980).

Figura 22-9. Ovocito de cerdo. Se observa la zona pelúcida como una cubierta semitransparente en la parte externa y su citoplasma cubierto totalmente por una gran cantidad de glóbulos de grasa (40X).

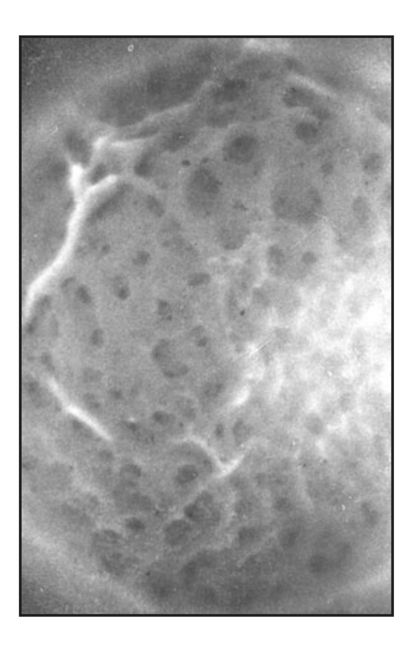


Figura 22-10. Zona pelúcida de un ovocito de cerdo tratado con anticuerpos anti-zona pelúcida, en la que se muestra su estructura reticular (100X).

En varias especies de mamíferos, se han identificado principalmente tres familias de glicoproteínas, que varían en su peso molecular al ser identificadas por electroforesis de dos dimensiones. En ratón, la zona pelúcida está constituida por glicoproteínas de 185, 140 y 83 kDa de peso molecular, denominadas ZP1, ZP2 y ZP3, respectivamente. En el humano, en condiciones reductoras, se han encontrado familias de glicoproteínas con pesos de 90 a 110 kDa para la ZP1, de 64 a 78 kDa para la ZP2 y de 57 a 73 kDa para la ZP3. En condiciones no reductoras, las familias ZP1 y ZP2 comigran en la electroforesis presentando un intervalo de pesos de 92 a 120 kDa (Wassarman, 1989).

En el cerdo, la zona pelúcida, en condiciones no reducidas, presenta dos glicoproteínas con pesos de 55 y 90 kDa. En condiciones reductoras, se obtienen cuatro componentes con pesos moleculares de 25, 55, 65 y 90 kDa, siendo los componentes de 25 y 65 kDa derivados de la glicoproteína de 90 kDa. El componente 55 kDa está constituido por dos glicoproteínas química e inmunológicamente diferentes, denominadas 55 kDa α y 55 kDa β que comigran en la electroforesis, pero que se distinguen claramente cuando se desglicosilan, dando por resultado dos péptidos de 37 y 40 kDa, respectivamente. Las familias 55 kDa α y β constituyen 80% del total de las glicoproteínas de la zona pelúcida, y a la 55kDa α se le ha conferido una función de receptor de los espermatozoides (figura 22-11) (Hedrick y Wardrip, 1987).

Algunos estudios de hibridación *in situ*, usando sondas moleculares para las glicoproteínas ZP2 y ZP3, muestran que el ovicito al ir madurando tiene la capacidad de sintetizar todas las glicoproteínas de la zona pelúcida, lo que demuestra que él es el responsable de la producción de esta estructura y no las células del cúmulo.

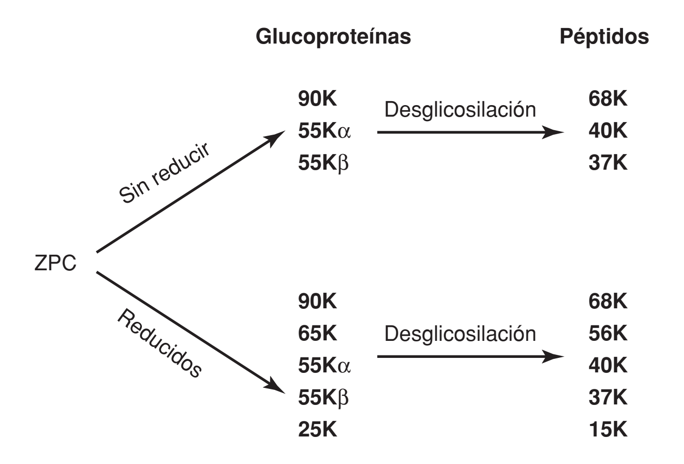


Figura 22-11. Diferentes familias de glicoproteínas de la zona pelúcida de cerdo, reducidas o no con β-mercaptoetanol y los componentes peptídicos que se producen después de la desglicosilación.

Para que los espermatozoides puedan penetrar la zona pelúcida, deben estar capacitados y llevar a cabo la reacción acrosomal; estos procesos ya han sido descritos con detalle previamente. Ahora se describe cómo el espermatozoide reconoce su sitio en la zona pelúcida dando inicio a la fertilización.

Los espermatozoides que han penetrado el *cumulus oophorus* se unen firmemente a la superficie de la zona pelúcida. Esta unión está mediada por la interacción de las moléculas de la superficie de ambas células. En el ratón se ha estudiado más ampliamente esta interacción, en la que las glicoproteínas ZP2 y ZP3 tienen actividad receptora para los espermatozoides. La ZP3 es el ligando primario o inicial que une la zona pelúcida a la membrana del espermatozoide intacto antes de llevar a cabo la reacción acrosomal. Esta unión se lleva a cabo con los oligosacáridos con enlace *O*-glicosídico en esta glicoproteína y está mediada por la enzima galactosil-transferasa del espermatozoide. Otra función de este componente de la zona pelúcida es la de disparar la reacción acrosomal, en la que es necesaria la participación de la porción peptídica de esta molécula.

La reacción acrosomal libera proteasas e hialuronidasa que son esenciales para la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida y se exponen otras proteínas de la superficie interna del acrosoma que se unen a la ZP2 para mantenerlo fuertemente adherido durante su paso por la zona pelúcida.

La reacción acrosomal libera proteasas e hialuronidasa que son esenciales para la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida.

Después de que ocurre la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, aquél debe atravesarla para lo que se han propuesto dos hipótesis, la mecánica y la enzimática.

La hipótesis mecánica se basa en que la fuerza generada por el espermatozoide puede ser hasta de 3,000 μdinas, suficiente para romper los puentes disulfuro de las glicoproteínas, una vez que el espermatozoide se ha unido a la zona pelúcida y a que la acción de inhibidores de proteasas no detiene su penetración.

En contraste, la hipótesis enzimática se basa en que los espermatozoides que no llevan a cabo reacción acrosomal no pueden penetrar la zona pelúcida. La acrosina hidroliza a todas las glicoproteínas de la zona pelú-

cida, pero a diferencia de la tripsina lo hace de una manera específica, ya que sólo digiere las proteínas necesarias para su paso sin destruir totalmente la zona, pues es preciso que esta estructura conserve su integridad después de que concluya la fertilización. Esta enzima cuando es liberada del acrosoma tiene una forma inactiva llamada proacrosina, la cual, en presencia de concentraciones mínimas de glicoproteínas de la zona, se activa como acrosina.

Estas dos hipótesis no son excluyentes, dado que la acrosina pudiera ser necesaria para ir digiriendo las moléculas, dándole el espacio suficiente al espermatozoide para poder desplazarse y atravesar completamente la zona pelúcida.

Fusión del espermatozoide con el ovocito

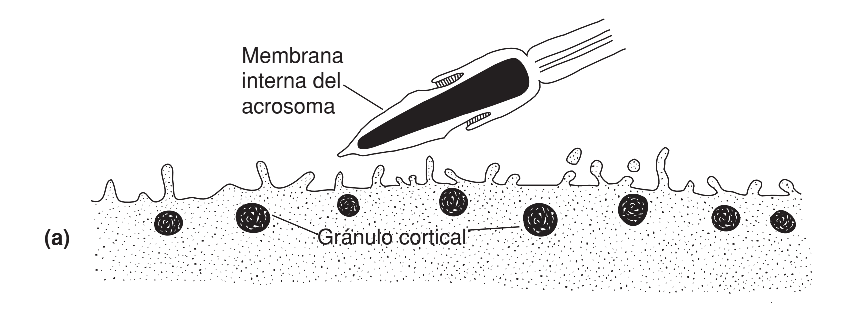
Después de que el espermatozoide ha pasado a través de la zona pelúcida, cruza rápidamente el espacio perivitelino, su cabeza se une a la membrana plasmática del ovocito (oolema) y finalmente su cuerpo completo se incorpora al citoplasma (ooplasma).

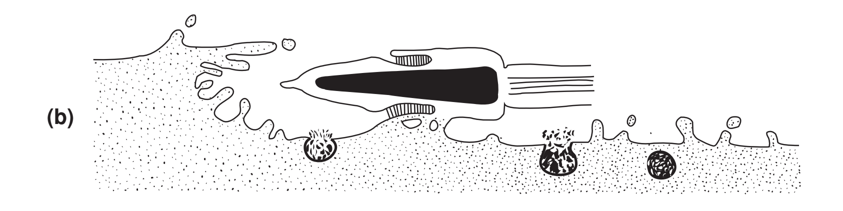
Después de que el espermatozoide ha pasado a través de la zona pelúcida, cruza rápidamente el espacio perivitelino, su cabeza se une a la membrana plasmática del ovocito (oolema) y finalmente su cuerpo completo se incorpora al citoplasma (ooplasma). El primer contacto es cuando el espermatozoide se posa sobre los microfilamentos de la superficie del ovocito para que los microfilamentos adyacentes se alarguen rápidamente para rodear al espermatozoide y así asegurar que se una firmemente y pueda fusionarse con el ovocito.

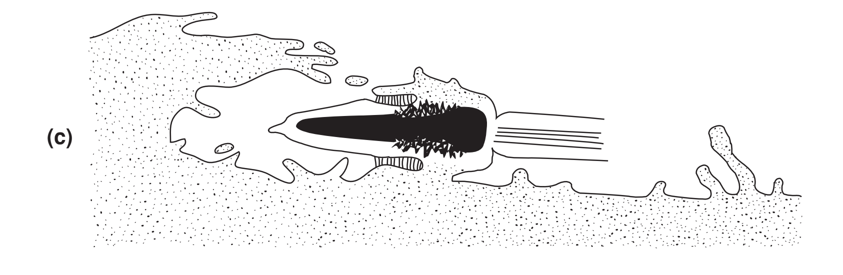
En todos los animales, excepto en los mamíferos euterios, la membrana interna del acrosoma se fusiona primero con el oolema. En los euterios, como ratón, cerdo y bovino, es la región ecuatorial de la membrana plasmática del espermatozoide la que se fusiona con el oolema. La región posterior de la cabeza y la cola son consecutivamente incorporados por medio de la fusión de sus membranas, mientras que la región anterior de la cabeza con la parte interna del acrosoma expuesta es fagocitada por el ovocito (figura 22-12).

En algunos mamíferos como el criceto, se ha demostrado que existe una proteína transmembranal, denominada PH-30, la cual se expone durante la reacción acrosomal, que parece intervenir en la consecución de todo este proceso. Esta proteína está formada por dos subunidades glicosiladas, α y β, unidas firmemente por uniones no covalentes. El dominio extracelular de la subunidad α contiene una región hidrofóbica de cerca de 20 residuos de aminoácidos que, seguramente, es la responsable del inicio de la fusión membranal por su parecido a las regiones fusógenas de proteínas virales.

El dominio extracelular de la subunidad β semeja a un dominio de las proteínas que se unen a integrinas, proteínas con función de receptores de la superficie celular que ayudan a las células a unirse a la matriz extracelular. Estas evidencias sugieren que la subunidad β de la PH-30 se une a una integrina de la superficie del ovocito para asegurar la íntima unión del espermatozoide previa a la fusión de las membranas y es en este momento cuando se inicia la activación del ovocito.







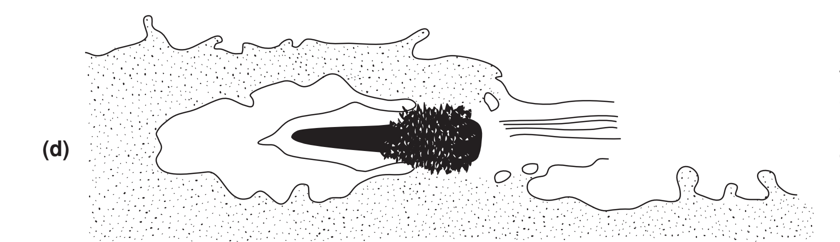


Figura 22-12. Diagrama de los primeros estados de la fusión del ovocito con el espermatozoide, donde se observan los gránulos corticales y la fusión de las membranas de los gametos (modificada de Yanagimachi, 1994).

Bloqueo inmunológico de la fertilización

Un aplicación de las investigaciones acerca de los diversos aspectos de la fertilización es la posibilidad de producir un bloqueo inmunológico a través de anticuerpos dirigidos contra alguna de las diferentes moléculas que intervienen en este proceso.

En años recientes se ha demostrado la potente inmunogenicidad de la zona pelúcida de ovocitos de diversas especies. Se han producido anticuerpos que, al unirse a las moléculas de la superficie de la zona pelúcida, forman un complejo antígeno-anticuerpo que impide a los espermatozoides reco-

nocer sus sitios receptores evitando de esta manera la unión y penetración a través de la zona pelúcida. A la fecha se ha logrado inhibir la fertilización de animales experimentales, aunque en el humano aún no es posible su aplicación, pues se han encontrado efectos secundarios como la destrucción total de los folículos, produciéndose de esta manera no infertilidad sino esterilidad. Además, no es posible predecir la duración del periodo de infertilidad que puede ser desde meses hasta años. Sin embargo, a nivel poblacional en animales silvestres, efectivamente se ha reducido el porcentaje de fertilidad en hembras inmunizadas con zona pelúcida, restaurándose la fertilidad después de cierto tiempo. Por ejemplo, en poblaciones de caballos salvajes con protección ecológica que se han reproducido más de lo esperado, se ha recurrido al método de inmunización con zona pelúcida, reduciéndose de este modo su tasa de reproducción (Fierro y cols., 1994; Betancourt y cols., 1996).

Activación del ovocito

Al fusionarse el espermatozoide con el ovocito, se producen en este último una serie de sucesos que constituyen el proceso de activación.

Al fusionarse el espermatozoide con el ovocito, se producen en este último una serie de sucesos que constituyen el proceso de activación. Estos cambios son de tipo morfológico y bioquímico y dan por resultado la división del ovocito fertilizado, que desde este momento se conoce como cigoto, su diferenciación y la formación de un nuevo individuo con genoma diploide.

Después de que se produce el rompimiento de la vesícula germinal y se inicia la maduración del ovocito, se libera el primer cuerpo polar como resultado de la primera división meiótica; inmediatamente se inicia la segunda división; sin embargo, ésta es detenida en la segunda metafase, la cual sólo se reanuda con la penetración del espermatozoide, liberándose el segundo cuerpo polar y dando como resultado que el ovocito adquiera un complemento haploide (figura 22-4) (Yanagimachi, 1994).

En los mamíferos, la liberación de los gránulos corticales para impedir la entrada de espermatozoides adicionales y la reanudación de la segunda división meiótica, son la prueba más clara de que el ovocito ha sido activado.

El espermatozoide, ya en el citoplasma del ovocito, sufre una transformación simultánea a la descrita anteriormente en el ovocito y su núcleo comienza a descondensarse, transformándose en el pronúcleo masculino.

La activación del ovocito se conoce más detalladamente en el erizo de mar y en los anfibios. Con respecto a los mamíferos, la especie más estudiada ha sido el criceto. En él se ha visto que los fenómenos que ocurren durante la activación del ovocito se llevan a cabo en una forma más lenta que la que se produce en el erizo de mar. En el criceto, la exocitosis de los gránulos corticales se lleva a cabo en aproximadamente 5 minutos después de la unión del espermatozoide con el oolema, en tanto que en el erizo este proceso se realiza en unos 20 segundos; sin embargo, los cambios son similares (figura 22-13) (Yanagimachi, 1994).

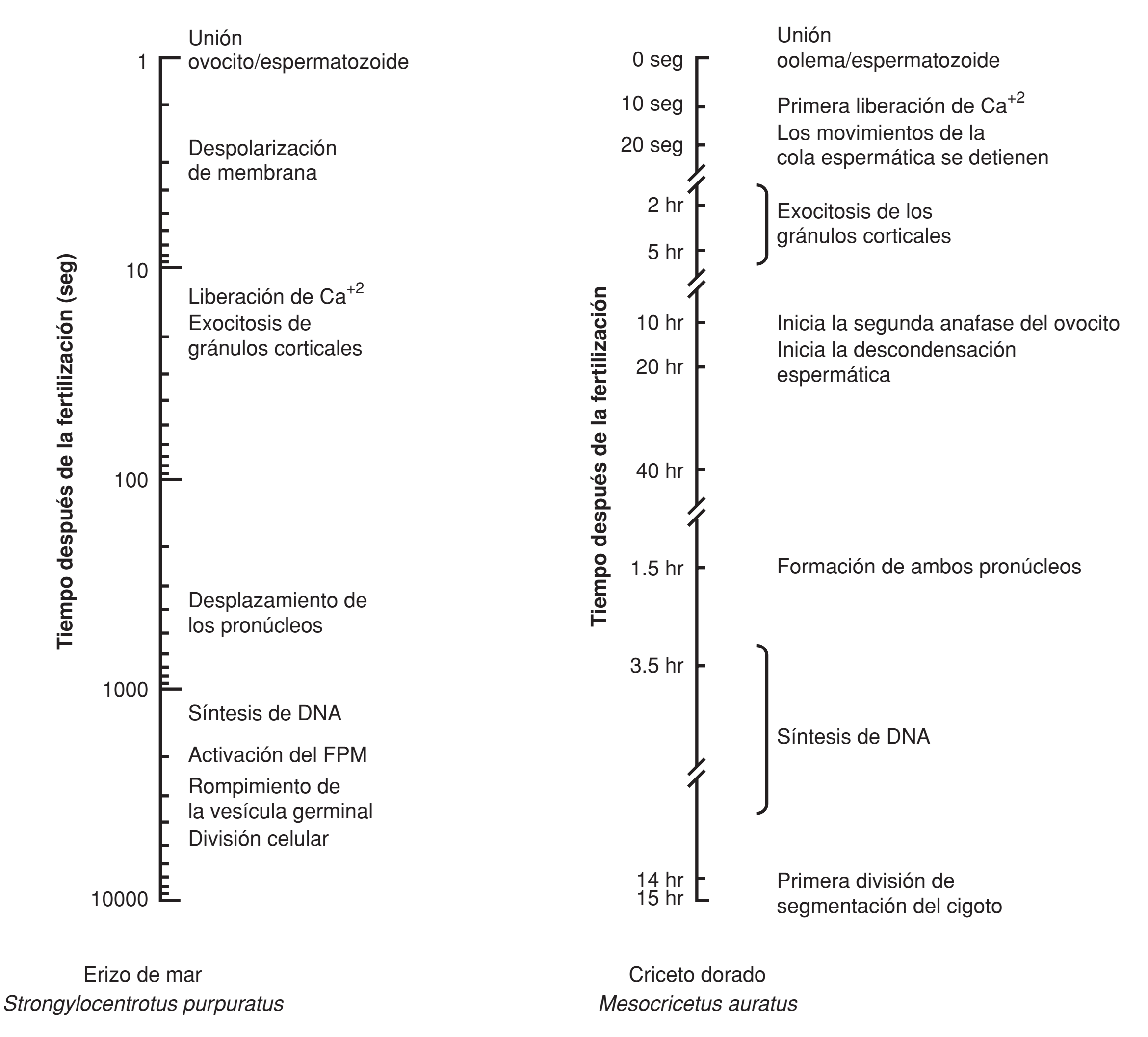


Figura 22-13. Secuencia de los cambios que ocurren durante la fertilización en el criceto y en el erizo de mar.

Cuando se fusiona el espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito, se activa la ruta del inositoltrifosfato; esto provoca un aumento de Ca^{+2} en el citosol que se inicia en la región donde se produjo la penetración del espermatozoide y se extiende hacia el resto del ovocito. La liberación de los iones de Ca^{+2} produce por un lado la exocitosis de los granúlos corticales y por otro provoca pulsos de hiperpolarización periódicos en la membrana plasmática. Los cambios en la membrana plasmática se realizan en forma simultánea y son debidos a la activación de la proteína G (Alberts y cols., 1994; Yanagimachi, 1994).

La proteína cinasa C activada por el DAG provoca un rompimiento en el equilibrio en la fosforilación y desfosforilación de algunas proteínas, lo cual conduce a la modulación de los canales iónicos de calcio en la membrana y a la inactivación del FPM y a la del factor citostático. Estos cambios y el aumento del pH conducen a la liberación de la segunda detención meió-

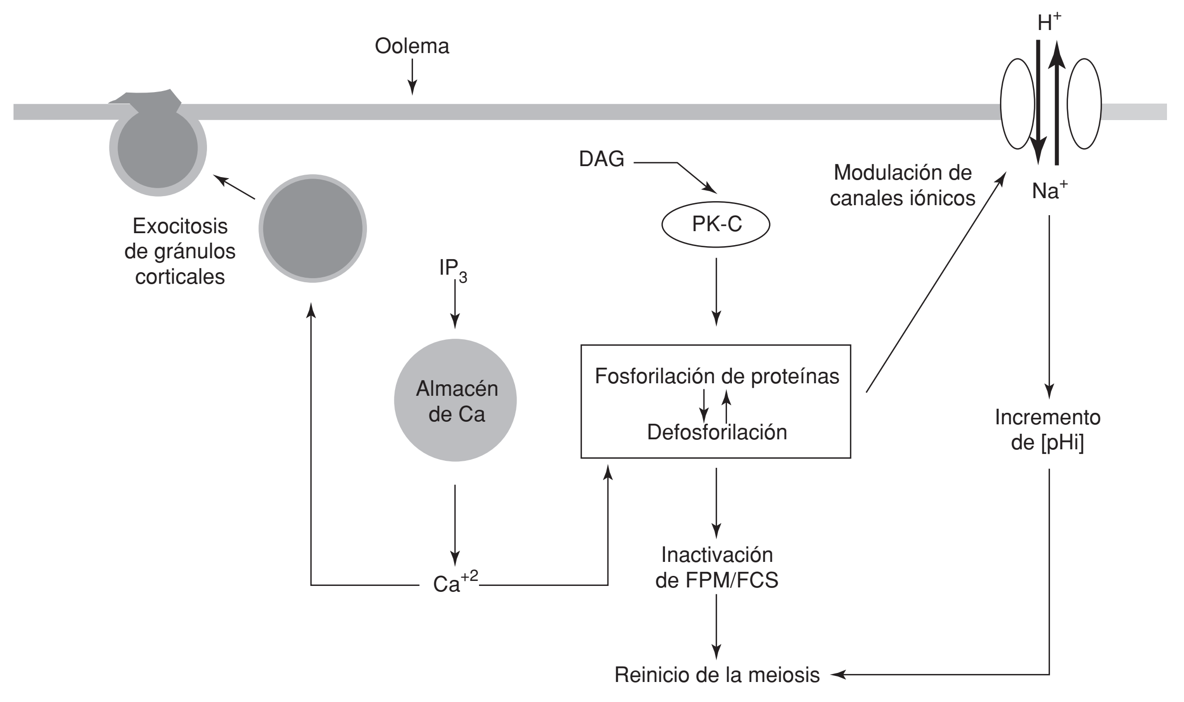


Figura 22-14. Ruta hipotética mediante la cual la liberación del Ca^{+2} induce la exocitosis de los granúlos corticales.

tica y la segunda metafase prosigue para expulsar el segundo cuerpo polar. Los cambios que ocurren durante la activación del ovocito se esquematizan en la figura 22-14.

Experimentalmente se ha observado que se puede inducir la activación artificial del ovocito, cuando se aumenta la concentración de Ca^{+2} en la célula, del mismo modo que se puede bloquear al utilizar agentes quelantes como EGTA.

En la mayoría de las especies, los ovocitos no fertilizados no se activan y el huso metafásico se desintegra; sin embargo, en algunos casos, cuando el ovocito envejece, puede haber una activación espontánea, tanto *in vivo* como *in vitro*. Los ovocitos de rata pueden activarse y expulsar el segundo cuerpo polar, pero sin que ocurra la formación del pronúcleo femenino, mientras que en el criceto dorado se puede formar un pronúcleo sin que se expulse el segundo cuerpo polar, por lo que su contenido cromosómico es diploide.

Mediante estimulación eléctrica o mecánica, puede lograrse la activación en los ovocitos de algunas especies de mamíferos, como el ratón y el cerdo. Los ovocitos activados espontáneamente pueden lograr una división partenogénica (sin la participación del espermatozoide), produciéndose las primeras divisiones del embrión; sin embargo, el desarrollo embrionario no prospera y presenta posteriormente una degeneración (Yanagimachi, 1994; Gilbert, 1994).

Reacción cortical y bloqueo a la polispermia

Los gránulos corticales son organelos esféricos y membranosos que se encuentran en el ovocito no fertilizado. Al realizarse la fertilización y la activación del ovocito, los gránulos corticales se fusionan con la membrana plasmática del ovocito y mediante la liberación de su contenido enzimático hacia el espacio perivitelino, se alteran las propiedades de la zona pelúcida, produciendo un bloqueo a la entrada de espermatozoides adicionales, lo que se conoce como polispermia (Wassarman, 1994). La polispermia puede producirse *in vivo* cuando un número exagerado de espermatozoides alcanza el sitio donde se lleva a cabo la fertilización, ya sea de forma natural o cuando se realiza inseminación artificial. Se cree que otra causa de la polispermia, tanto *in vivo* como *in vitro*, puede ser la fertilización de ovocitos inmaduros o posmaduros en los cuales la reacción cortical es inadecuada y la exocitosis de los gránulos corticales es deficiente, permitiendo el paso de varios espermatozoides. En cualquiera de los casos, la polispermia provoca que el cigoto (ovocito fertilizado) tenga una o más dotaciones de material génico que produce alteraciones durante el desarrollo, por lo que los embriones producidos de esta manera no son viables (Funahashi y Day, 1992, Veeck, 1991; Trounson y Osborn, 1993).

Los gránulos corticales son organelos esféricos y membranosos que se encuentran en el ovocito no fertilizado.

Durante la ovogénesis y la maduración meiótica, los gránulos corticales se originan a partir del aparato de Golgi, aumentan su número y se desplazan hacia la periferia del ovocito, como un proceso preliminar a la fertilización (Wassarman, 1994).

Durante la ovogénesis y la maduración meiótica, los gránulos corticales se originan a partir del aparato de Golgi.

Los gránulos corticales de los mamíferos se observaron por primera vez en el ovocito de criceto, como pequeños gránulos de 0.1 a 0.5 µm de diámetro que se encontraban en la periferia y que desaparecían después de la fertilización.

Se concluyó que esas estructuras eran homólogas a las observadas en el erizo de mar y que deberían tener importancia en los cambios de la envoltura del ovocito durante la fertilización. Los gránulos corticales se han encontrado en los ovocitos de todos los mamíferos y contienen mucopolisacáridos, proteasas, activador de plasminógeno tisular con actividad de proteasa de serina, fosfatasa ácida y peroxidasa.

Aunque casi no se conocen los procesos moleculares durante la exocitosis de los gránulos corticales en los mamíferos, se han realizado estudios con ovocitos de criceto fertilizados *in vitro* y se ha observado que la exocitosis comienza en menos de dos minutos después de la unión del ovocito con el espermatozoide (Yanagimachi, 1994).

La liberación del Ca^{+2} producida durante la activación del ovocito induce la exocitosis de los gránulos corticales. Sólo los ovocitos que han completado su maduración son capaces de presentar la exocitosis de los gránulos corticales en presencia del espermatozoide; esta facultad va apareciendo durante la primera metafase y alcanza su nivel normal en la segunda metafase meiótica.

Bloqueo a la polispermia

Una vez que el espermatozoide se ha fusionado con el ovocito, se cuenta con dos mecanismos para asegurar que sólo un espermatozoide pueda fusionarse con éste.

Una vez que el espermatozoide se ha fusionado con el ovocito, se cuenta con dos mecanismos para asegurar que sólo un espermatozoide pueda fusionarse con el ovocito, provocando cambios bioquímicos y biofísicos en la membrana plasmática y en la zona pelúcida.

El primer bloqueo ocurre en la membrana plasmática, ya que la entrada del primer espermatozoide produce una despolarización transitoria en ésta, impidiendo la entrada de espermatozoides secundarios. El oolema reduce drásticamente su potencialidad de fusionarse con espermatozoides después de que se lleva a cabo la fertilización. Este bloqueo se establece un minuto después de que se ha llevado acabo la fusión. El mecanismo de este primer bloqueo no se conoce en su totalidad, pero se sabe que es independiente de la exocitosis de los granúlos corticales (Yanagimachi, 1994; Alberts y cols., 1994; Bazer y cols., 1993).

Ya que el potencial de membrana regresa a la normalidad inmediatamente después de la fertilización, se requiere de un segundo bloqueo a la polispermia que está dado por la liberación de los gránulos corticales hacia el espacio perivitelino. En los mamíferos, los gránulos corticales liberan enzimas que modifican la composición de la zona pelúcida, produciendo la reacción de zona o reacción cortical. Durante ésta, la ZP3 y ZP2 se modifican endureciendo a la zona pelúcida e inactivando los receptores de los espermatozoides. Las enzimas de los gránulos corticales cortan los residuos terminales de los oligosacáridos de la glicoproteína ZP3 involucrada en la unión del espermatozoide, impidiendo la entrada de espermatozoides secundarios. También la ZP2 es modificada por las proteasas, perdiendo su capacidad de unión (Alberts y cols., 1994).

En todos los mamíferos, tanto la zona pelúcida como la membrana plasmática del ovocito actúan conjuntamente para evitar la polispermia; sin embargo, en algunas especies uno u otro medio puede ser el más importante para impedirla. De acuerdo a esto, se han propuesto tres grupos de mamíferos, en base al mecanismo principal del bloqueo que se presenta (tabla 22-1; Yanagimachi, 1994).

Tabla 22-1 Clasificación de los mamíferos basada en el principal mecanismo de bloqueo a la polispermia (Yanagimachi, 1994).

Grupo	Especie	Características	Mecanismo principal de bloqueo
I	Criceto Perro Borrego Humano	Rara vez se observan espermatozoides adicionales en el espacio perivitelino	Reacción de zona
II	Topo Conejo Murciélago	Presencia de espermatozoides en el espacio perivitelino	Membrana plasmática
III	Rata Ratón Cobayo Gato	Pocos espermatozoides en el espacio perivitelino	Reacción de zona y membrana plasmática

Descondensación del núcleo del espermatozoide

Cuando el espermatozoide penetra en el ovocito maduro y lo activa, éste completa la segunda división meiótica y libera el segundo cuerpo polar al espacio perivitelino. Por su parte, el espermatozoide también experimenta una serie de cambios antes de que su contenido cromosómico se una al del ovocito.

El espermatozoide experimenta una serie de cambios antes de que su contenido cromosómico se una al del ovocito.

El primer cambio que ocurre en el núcleo del espermatozoide es el rompimiento de la envoltura nuclear, que comienza en la región del segmento ecuatorial, extendiéndose hacia la región anterior y posterior. De esta manera, el material nuclear se incorpora al citoplasma del ovocito antes de que ocurra la descondensación del núcleo espermático.

Durante la transformación de las espermátidas a espermatozoides, las histonas son reemplazadas por protaminas ricas en arginina, serina y cisteína; este reemplazo de proteínas coincide con la compactación de la cromatina, suprimiéndose la transcripción en el núcleo.

Cuando los espermatozoides maduran en el epidídimo, hay cambios en las protaminas, sustituyéndose los grupos tiol (SH) por enlaces disulfuro (S-S). Esta transformación permite que los núcleos de los espermatozoides de los mamíferos aumenten su resistencia a las fluctuaciones físicas y químicas, además de conferirle rigidez a su cabeza, la cual es necesaria para atravesar la zona pelúcida.

Para que se efectúe la descondensación del núcleo del espermatozoide se requieren condiciones específicas en el citoplasma del ovocito, como el rompimiento de la vesícula germinal y la presencia de un componente en el citoplasma del ovocito llamado factor de descondensación del núcleo del espermatozoide, ya que los ovocitos inmaduros son incapaces de inducir la descondensación nuclear del espermatozoide y la formación del pronúcleo.

Después de que el espermatozoide penetra en el citoplasma del ovocito, su núcleo pierde las protaminas. Los enlaces disulfuro en las protaminas nucleares se reducen y el cambio de éstas por histonas está asociado a la descondensación del núcleo. Las proteínas de la cromatina condensada del espermatozoide son cambiadas por proteínas provenientes del ovocito, lo cual permite la descondensación de la cromatina espermática. La descondensación puede ser inducida artificialmente por el tratamiento del núcleo del espermatozoide con agentes reductores como el glutatión (GSH) contenido en el ovocito.

La concentración de glutatión es un factor importante para la descondensación del núcleo espermático, pues se ha observado que la reducción de los enlaces disulfuro está acompañada por la disminución de los niveles de glutatión, el cual es abundante en el citoplasma del ovocito maduro (Yanagimachi, 1994).

Desarrollo del pronúcleo y singamia

Una vez que se descondensa la cromatina del núcleo del espermatozoide, se forma el pronúcleo masculino, el cual va aumentando de tamaño mientras que el núcleo del ovocito completa su segunda división meiótica y forma el

pronúcleo femenino. La activación del ovocito es esencial para que el núcleo descondensado del espermatozoide se transforme en el pronúcleo.

En los mamíferos, el proceso de la fusión de los dos pronúcleos dura aproximadamente doce horas.

En los mamíferos, el proceso de la fusión de los dos pronúcleos dura aproximadamente doce horas. Cuando los ovocitos de cerdo son madurados y fertilizados *in vitro* con el *cumulus oophorus*, el espermatozoide se transforma en un pronúcleo bien desarrollado; sin embargo, si durante la maduración *in vitro* se remueven las células del cúmulo, muy rara vez se desarrolla el pronúcleo masculino como producto de la fertilización.

En el citoplasma del ovocito existe una sustancia llamada factor de crecimiento del pronúcleo masculino que, al parecer, sólo es producido cuando el ovocito madura en compañía del *cumulus oophorus*. Cuando un ovocito libre de la zona pelúcida es penetrado por un espermatozoide de otra especie, éste puede dar lugar a un pronúcleo masculino bien desarrollado, por lo que se cree que este factor no es especie-específico.

La síntesis de glutatión durante la maduración del ovocito es un requisito para la formación del pronúcleo masculino en el ratón y en el criceto (Niwa, 1993).

Horas después de la fusión de los gametos, se inicia la síntesis del DNA tanto en el pronúcleo femenino como en el masculino.

Horas después de la fusión de los gametos, se inicia la síntesis del DNA tanto en el pronúcleo femenino como en el masculino y su duración es determinada por factores presentes en el ovocito, iniciándose la síntesis de proteínas, algunas de las cuales son activadoras de la mitosis. La etapa en la que los dos pronúcleos son visibles se conoce como estado pronuclear o precigótico.

Inmediatamente después de su formación, los pronúcleos se encuentran distantes uno del otro; poco después, los dos emigran hacia el centro del ovocito y se ven muy cercanos, sus superficies forman interdigitaciones y se entrelazan las membranas nucleares que se fusionan; a esta unión se le conoce como singamia (figura 22-15; Yanagimachi, 1994; Alberts y cols., 1994; Veeck, 1991).

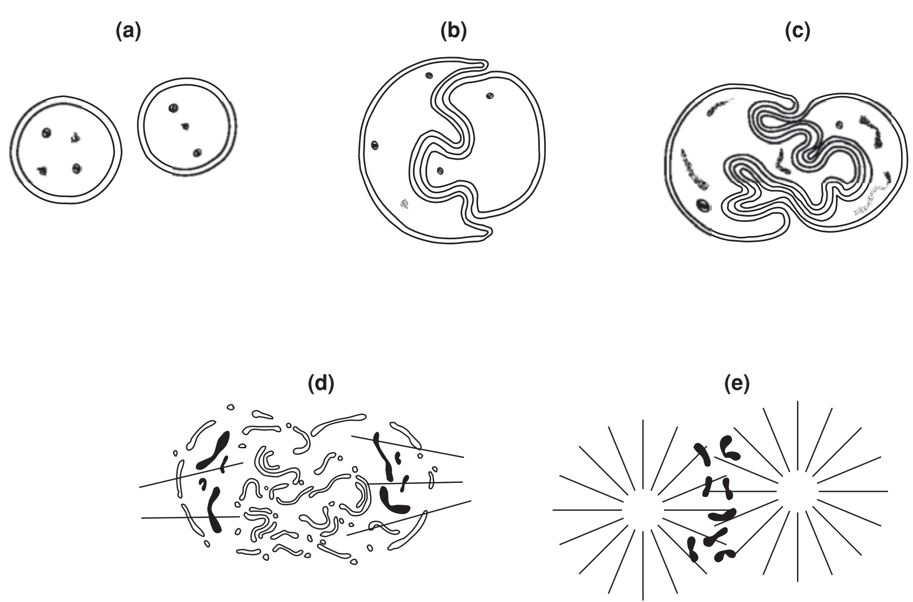


Figura 22-15. Sucesos que ocurren durante la singamia. **a)** Aproximación de los pronúcleos. **b)** y **c)** Interdigitaciones de la envoltura de los pronúcleos en el momento de fusionarse. **d)** Unión del complemento cromosómico de ambos pronúcleos. **e)** Primera división mitótica (modificada de Yanagimachi, 1994).

Durante la singamia en el humano, se pueden apreciar los pronúcleos como una estructura en forma de 8 o un doble anillo, pero al microscopio electrónico se observan separados por estrecho puente. La envoltura nuclear desaparece, permitiendo la unión de los cromosomas paternos y maternos. De esta forma se forma el cigoto, en el que hay caracteres de los dos progenitores y se restaura el estado diploide de la especie (Veeck, 1991).

La singamia es considerada como el último evento de la fertilización y comienzo del desarrollo embrionario.

En la figura 22-16, se muestra un resumen esquemático de los procesos que ocurren durante la fertilización en los mamíferos y, como se aprecia en este capítulo, éste es un proceso dinámico con gran complejidad de estructuras y sucesos que involucran la interacción entre las dos células fundamentales: los gametos. Éste es sólo un ejemplo de las interacciones que se producen entre las células durante el desarrollo del animal. Las actuales investigaciones sobre este fenómeno nos deben llevar a nuevos planteamientos de las interacciones celulares en lo general que serán vitales en su aplicación en la medicina y otros campos de la biología.

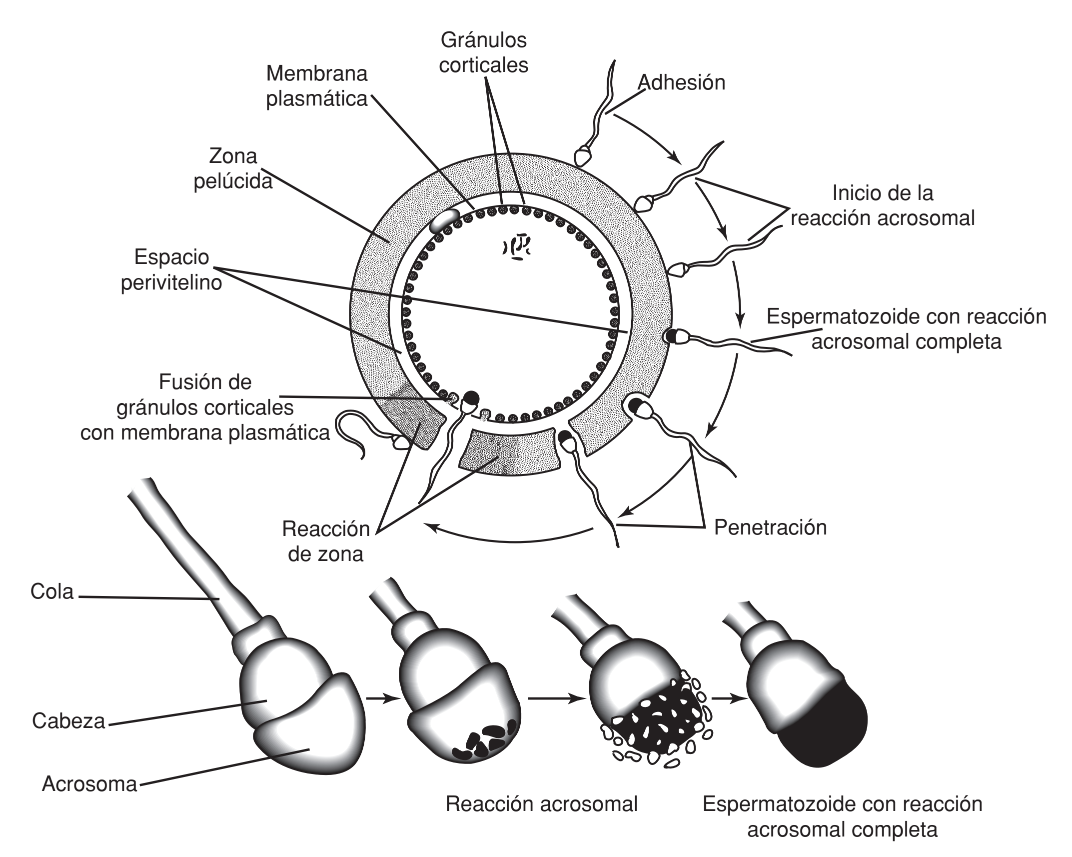


Figura 22-16. Etapas de la interacción de gametos de mamífero que ocurren durante la fertilización. Después de que el espermatozoide se une a la zona pelúcida, tiene lugar la reacción acrosomal. La membrana externa del acrosoma se fusiona en múltiples puntos con la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide, liberándose las enzimas acrosomales. Estas enzimas hidrolizan a la zona pelúcida, lo que permite la penetración del espermatozoide, que se une a la membrana plasmática del ovocito y se fusiona con ella para fecundarlo. Por último, se produce la reacción de zona, en la que los gránulos corticales vierten su contenido enzimático hacia la zona pelúcida, modificando su estructura química hasta transformarla en una barrera impenetrable a los espermatozoides restantes, evitando así la polispermia.



Referencias bibliográficas

Ahmad, K.; Bracho, G.E.; Wolf, D.P. y Tash, J.S., "Regulation of human sperm motility and hyperactivation components by calcium, calmodulin, and protein phosphatases", *Arch. Androl.,* **35:** 187-208, 1995.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J.D., *The Molecular Biology of the Cell.,* 3a., ed., Garland Pub., Nueva York, 1011-1035, 1994.

Bazer, F.W.; Geisert, R.D. y Zavy, M.T., "Fertilization, cleavage and implantation", *Reproduction in farm animals,* 6a., ed., en Hafez, E.S.E., ed., Lea y Febiger Pub., Filadelfia, 188-212, 1993.

Benoff, S.; Cooper, G.W.; Hurley, I.; Mandel, F.S. y Rosenfeld, D.L., "Antisperm antibody binding to human sperm inhibits capacitation induced changes in the levels of plasma membrane sterols", *Am. J. Reprod. Immunol.,* **30:** 113-130, 1993.

Betancourt, M.; Bonilla, E.; Casas, E.; Ducolomb, Y. y Fierro, R., "Contraceptive vaccines", *Advances in contraceptive vaccines,* **12:** 35-40, 1996.

———— ; Fierro, R. y Ambriz, D., "*In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro", Theriogenology,* **40:** 1155-1160, 1993.

Bonilla, E.; Velasco, R.; Casas, E.; Ducolomb, Y. y Betancourt, M., "Inhibition of the pig sperm acrosome reaction by a decapacitation factor from pig seminal plasma", *Med. Sci. Res.,* **24:** 75-77, 1996.

Boue, F.; Duquenne, C.; Lasalle, B.; Lefevre, A. y Finaz, C., "FLB1, a human protein of epididymal origin that is involved in the sperm-oocyte recognition process", *Biol. Reprod.,* **52:** 267-278, 1995.

Dekel, N., "Molecular control of meiosis", *Trends Endocrinol. Metab.,* **6:** 165-169, 1995.

Desnoyers, L. y Manjunath, P., "Major proteins of bovine seminal fluid bind to insuline-like growth factor-II", *J. Biol. Chem.,* **269:** 5776-5780, 1994.

Dominguez, L.; Diaz, A.; Fornes, W. y Mayorga, L.S., "Reagents that activate GTP-binding proteins trigger the acrosome reaction in human spermatozoa", *Int. J. Androl.,* **18:** 203-207, 1995.

Dunbar, B.S.; Prasad, S.V. y Timmons, T.M., "Comparative structure and function of mammalian zonae pellucidae", *A comparative overview of mammalian fertilization,* en Dunbar, B.S. y O`Rand, M.G., eds., Plenum Press, Nueva York, 97-114, 1991.

———— ; Wardrip, N.J. y Hedrick, J.L., "Isolation, physicochemical properties, and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes", *Biochem.,* **2:** 356-365, 1980.

Eddy, E.M. y O'Brien, D.A., "The spermatozoon", en *The physiology of reproduction,* 2a., ed., Knobil E. y Neill, J.D., eds., Raven Press, Ltd., Nueva York, **1:** 29-77, 1994.

Eppig, J.J., "Intercommunication between mammalian oocyte and companion somatic cells", *Bioessays,* **13:** 569-574, 1991.

———— , "Regulation of mammalian oocyte maturation", en *The ovary,* Adashi, E.Y. y Leung, P.C.K., eds., Raven Press, Nueva York, 185-208, 1993.

Fierro, R.; Bonilla, E.; Casas, E.; Jiménez, I.; Ducolomb, Y. y Betancourt, M., "Inhibition of pig oocyte *in vitro* fertilization of components of the zona pellucida", *Theriogenology,* **42:** 227-234, 1994.

Funahashi, H. y Day, B.N., "Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes", *J. Reprod. Fertil.,* **99:** 97-103, 1992.

Gilbert, S.E., *Developmental Biology*, 4a., ed., Sunderland, Ma., *Sinauer Asoc. Inc. Pub.,* 121-159, 1994.

Hedrick, J.L. y Wardrip, J.N., "On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes", *Develop. Biol.,* **121:** 478-488, 1987.

Hunter, R.H.F., "Fertilization in the pig and horse", en *A comparative overview of mammalian fertilization,* Dunbar, B.S. y O`Rand, M.G., eds., Plenum Press, Nueva York, 329-349, 1991.

Leyton, L.; LeGuen, P.; Bunch, D. y Saling, P., "Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **89:** 11692-11695, 1992.

Liévano, A.; Santi, C.M.; Serrano, C.J.; Treviño, C.L.; Bellve, A.R.; Hernández, A. y Darszon, A., "T-Type Ca^{2+} channels and alpha1E expression in spermatogenic cells, ant their possible relevance to the sperm acrosome reaction", *FEBS Lett,* **388:** 150-154, 1996.

Lindner, H.R.; Bar-Ami, S. y Tsafriri, A., "Control of the resumption of meiosis in mammals", en *The Ovary,* Serra, G.B., ed., Raven Press, Nueva York, 83-94, 1983.

McGaughey, R.W., "*In vitro* oocyte maturation", en *Methods in mammalian reproduction,* Daniel, V.C., ed., Academic Press, Nueva York, 1-20, 1978.

Nigg, E.A., "Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle", *Bioessays,* **17:** 471-480, 1995.

Niwa, K., "Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs", *J. Reprod. Fertil. Suppl.,* **48:** 49-59, 1993.

Norbury, C. y Nurse, P., "Animal cell cycles and their control", *Ann Rev. Biochem.,* **61:** 441-470, 1992.

Parks, J.E. y Hough, S.R., "Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in bovine seminal plasma", *J. Androl.,* **14:** 335-339, 1993.

Roldan, E.R.S.; Murase, T. y Shi, Q., "Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida", *Science,* **266:** 1578-1581, 1994.

Runnebaum, I.B.; Schill, W.B. y Töpfer-Petersen, E., "ConA- Binding proteins of the sperm surface are conserved through evolution and in sperm maturation", *Andrologia,* **27:** 81-90, 1995.

Trounson, A. y Osborn, J., "Fertilization and embryo development", en *Handbook of in vitro fertilization,* Trounson, A. y David, K., eds., CRC. Press Inc., Boca Ratón, Florida, 57-80, 1993.

Veeck, L.L., "Atlas of the human oocyte and early conceptus", vol. 2, Williams y Wilkins, Baltimore, 1991.

Wassarman, P.M., "La fecundación en los mamíferos", *Investigación y Ciencia,* **149:** 48-55, 1989.

——— y Albertini, D.F., "The mammalian ovum", en *The physiology of reproduction,* Knobil, E. y Neill, J.D., eds., Raven Press, Ltd., Nueva York, **1:** 79-122, 1994.

Yanagimachi, R., "Mammalian Fertilization", en *The physiology of reproduction,* Knobil, E. y Neill, J.D., eds., 2a. ed., Raven Press, Ltd., Nueva York, **1:** 189-317, 1994.

CAPÍTULO 23

DIFERENCIACIÓN CELULAR DURANTE EL DESARROLLO DE LA GÓNADA

Horacio Merchant Larios ■ Norma Moreno Mendoza



Introducción

Los organismos multicelulares que se reproducen sexualmente se desarrollan a partir de una célula, el huevo fertilizado (cigoto), a partir del cual se diferencian varios tipos celulares especializados. La mayoría de los procesos de diferenciación celular se llevan a cabo durante el desarrollo embrionario y fetal, donde existe una organización adecuada de las células en cada generación. Al proceso que controla esta organización se le llama morfogénesis.

Un modelo para estudiar tanto la diferenciación celular como la morfogénesis es durante la formación de la gónada. En este órgano se llevan a cabo la proliferación, diferenciación y maduración de las células germinales primordiales, precursoras de los ovocitos y los espermatozoides en machos y hembras, respectivamente. Así, los embriones machos y hembras inician su desarrollo en forma similar, de manera que en ambos sexos se establecen estructuras idénticas a partir de las cuales se formarán los órganos reproductores correspondientes a cada sexo. La gónada fetal, dependiendo del sexo genético del individuo, se transformará en testículo u ovario.

Durante el desarrollo de las gónadas, existe desde el inicio una interacción entre dos líneas celulares: las células germinales (de origen extragonadal) y las células somáticas. De esta manera, las gónadas presentan un modelo de morfogénesis con un componente celular externo que interacciona con el componente local somático. En el presente capítulo consideraremos el desarrollo y diferenciación de la gónada en términos de estos dos tipos celulares, así como los factores moleculares involucrados.



Las células germinales primordiales (CGP)

Origen

> El sexo del individuo se establece en el momento de la fertilización.

Aunque el sexo del individuo, y con esto el sexo de los gametos, se establece en el momento de la fertilización, existe un periodo inicial en el cual no es

posible detectar diferencias entre las células precursoras de los ovocitos y los espermatozoides. Este periodo es el que corresponde al de las células germinales primordiales (CGP).

Desde el punto de vista del desarrollo ontogénico, el establecimiento de las distintas líneas celulares durante el desarrollo se lleva a cabo en diferentes tiempos. En el caso de las CGP, su determinación parece ser uno de los más tempranos, lo cual ha sido motivo de profundas reflexiones desde el siglo pasado.

August Weismann (1892) postuló el concepto sobre "la continuidad del plasma germinal", dividiendo en dos tipos a las células de un organismo: las células somáticas y las células germinales. Asume que ambos tipos se segregan desde las primeras divisiones del cigoto, de manera que las células germinales que conservan el "plasma germinal" son inmortales, en tanto que las somáticas poseen los determinantes para los diferentes tipos celulares que forman al organismo y cuya existencia no va más allá del periodo de vida del organismo.

En contraste con los postulados de Weismann, encontramos el concepto de "pangénesis" de Darwin, quien propuso que las células germinales se forman por la agregación de subunidades autorreplicables llamadas "gémulas", provenientes de todos los tejidos del organismo. Así, después de la fertilización, las células germinales pasarían a la siguiente generación, dando origen a los diferentes tejidos del organismo por un proceso de "desagregación de las gémulas", que a su vez repetirían el ciclo.

Estos dos conceptos a la luz de la biología moderna suenan discordantes en su concepción original, pero la idea de "continuidad" de Weismann y de "autorreplicación" de Darwin son actualmente aplicables al DNA y a los diversos organelos celulares.

Actualmente podemos plantear el problema de las CGP en términos de su "determinación", es decir, si el DNA se replica en copias idénticas, ¿cómo aparece la diversidad celular? En el caso de las células germinales, encontramos al menos dos respuestas posibles: una "preformista", la cual implica la existencia de factores determinantes del establecimiento de la línea germinal localizados en ciertas áreas del citoplasma del cigoto. Estos factores serían responsables de la regulación del genoma para que éste exprese el gen o los genes correspondientes a las células germinales primordiales. Otra respuesta podría ser "epigenética", donde hay una determinación relativamente tardía de la línea germinal, de manera que las células germinales primordiales se establecen en el embrión multicelular según la posición que ocupan en el conglomerado.

En algunas especies de invertebrados, la formación de las células germinales es dependiente de la acción de factores citoplásmicos localizados en una región determinada del huevo, presentes desde el momento de la fertilización. En dichas especies, la manipulación del "citoplasma germinal" o "plasma germinal" identificado en huevos de *Drosophila* (Ilmense y cols., 1976) demuestra que lo que está "preformado" y "localizado" en el huevo de los organismos que lo poseen, no son las células germinales primordiales, sino los factores que regulan la diferenciación de éstas. Sin embargo, existen organismos en los que la determinación de la línea germinal ocurre des-

pués de la gastrulación, por lo que su establecimiento dependería más de un fenómeno de "posición" celular que de "localización" citoplásmica.

Una serie de experimentos clásicos llevados a cabo en anfibios y aves demostraron que las CGP tienen un origen extraembrionario. La extirpación quirúrgica, la cauterización o irradiación con un haz de luz ultravioleta (UV), o de rayos X o *gamma* de la "creciente germinal", región extraembrionaria en la que se detectan las primeras CGP, conlleva al desarrollo de embriones estériles. Posteriormente, Reynaud corroboró el origen extraembrionario de las CGP. Inyectó, por vía endovenosa, una suspensión de células del endodermo de la "creciente germinal" de guajolote en un embrión de pollo previamente esterilizado por irradiación UV, y viceversa. Encontró que, al desarrollarse, los animales así tratados producen gametos correspondientes a las CGP de la especie inyectada. En los mamíferos, no se ha hecho una demostración experimental que apoye el origen extraembrionario de las CGP. Sin embargo, existen evidencias de que las CGP se derivan del ectodermo embrionario. Gardner (1975) trasplantó células de la masa celular interna o del ectodermo embrionario de embriones de ratones negros a blastocistos de ratones blancos. Éstos se desarrollaron en madres nodrizas. Después de cruzarlos, se observó que algunas de las crías fueron de color negro, lo que demostró que las células trasplantadas son capaces de dar origen a las CGP.

Las células germinales primordiales (CGP) tienen un origen extraembrionario.

Como se verá más adelante, las CGP presentan características morfológicas, citoquímicas y ultraestructurales que han permitido su identificación inicial en el endodermo del saco vitelino (membrana extraembrionaria). Esta evidencia también apoya fuertemente el origen extraembrionario en los mamíferos.

Migración

Chiquione en 1954 identificó por primera vez a las CGP en el embrión de ratón, por su gran actividad con la fosfatasa alcalina (figura 23-1). Describe

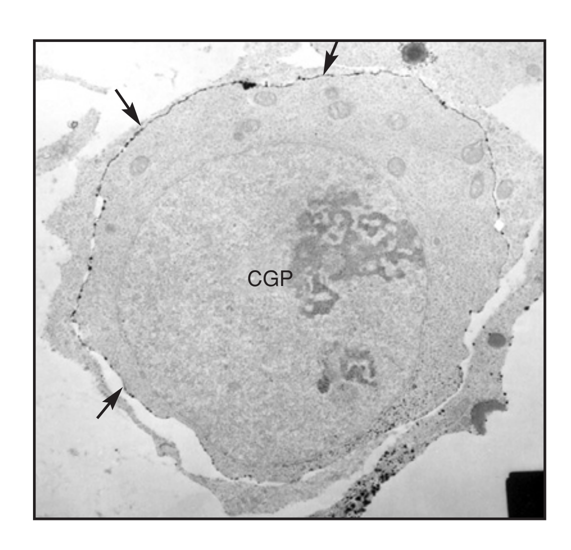


Figura 23-1. A nivel del microscopio electrónico se localiza la actividad de la fosfatasa alcalina en la membrana plasmática (flechas) de las células germinales primordiales (CGP).

a las CGP en embriones de ocho *días post coitum* (*dpc*) en tres sitios: en el extremo caudal de la línea primitiva, en el mesodermo de la base de la alantoides y en el endodermo del saco vitelino. En base a estas observaciones, propone que estas células podrían originarse en el saco vitelino debido a que éstas son más abundantes en esa región.

Por otro lado, Ozdzenski (1967), examinando embriones en etapas un poco más tempranas (siete *dpc*) —antes de la formación de la cabeza—, encontró que prácticamente todas las CGP se localizaban en el rudimento de la alantoides, lo cual representa una extensión de la línea primitiva. Posteriormente (ocho *dpc*) se observaron en el extremo caudal de la línea primitiva y en el endodermo del saco vitelino.

De la base de la alantoides, las CGP migran o son acarreadas hasta la región urogenital del embrión donde se formarán las gónadas. El desplazamiento de estas células se da por dos tipos de movimientos: *pasivo* y *activo*. El primero tiene lugar por una translocación de las CGP, localizadas en el endodermo y el mesénquima, vecino del saco vitelino y de la alantoides. Desde estas regiones, las CGP pasan al interior del embrión, junto con el endodermo y el mesénquima, que formarán al intestino primitivo posterior y al primordio del mesenterio intestinal. A partir de aquí se inicia la migración *activa* de las CGP, es decir, que tienen que valerse de su propia capacidad de locomoción para salir del intestino y atravesar la lámina basal que lo recubre. Este movimiento se manifiesta por emisión de pseudópodos capaces de romper la lámina basal del intestino y continuar su camino hacia las futuras crestas genitales a través de células somáticas estáticas o que se mueven en direcciones diferentes.

A pesar de algunos estudios recientes en los que se observa el comportamiento de las CGP *in vitro*, poco se sabe sobre los mecanismos que guían a estas células hasta su ubicación final en las crestas genitales. Se ha observado que las CGP son incapaces de desplazarse sobre vidrio, plástico, gelatina y colágena. En cambio dichas células se desplazan sobre una monocapa de células mesenquimáticas y sobre colágena a la que se le agrega fibronectina (Álvarez-Buylla y Merchant, 1986). Se observó que la fibronectina se encuentra concentrada a lo largo del camino que siguen las CGP hacia las crestas genitales. Aunque la fibronectina se ha asociado con el desplazamiento de las CGP, además del desplazamiento, el proceso que guía a estas células hasta las crestas genitales todavía se desconoce. Se han propuesto tres hipótesis para explicar la direccionalidad del desplazamiento de las CGP:

a) Existe un gradiente de concentración de algún factor secretado por las células del epitelio celómico situado en la región urogenital. De esta manera, las CGP se desplazarían por un proceso de quimiotaxis. La existencia de factores quimiotácticos ha sido sugerida por observaciones y experimentos en el embrión de pollo (Kuwana y cols., 1986). Aquí las CGP son transportadas por el sistema circulatorio, de manera que al pasar por la región urogenital atraviesan la pared de los vasos sanguíneos para dirigirse al epitelio celómico.

b) Existen "receptores" específicos en la superficie de las CGP, capaces de detectar a moléculas presentes en la superficie de las células mesenquimáticas y en la matriz extracelular, mecanismo denominado "guía por contacto". Por este mecanismo, las CGP seguirían un camino predeterminado, ya que sólo las células somáticas distribuidas en el camino hacia la cresta genital depositarían las moléculas de adhesión específica.

c) El tercer mecanismo propuesto es el más sencillo y se refiere a la organización topográfica de las células somáticas del embrión en el momento del desplazamiento de las CGP. Las células mesenquimáticas y la matriz extracelular están orientadas en tal forma, que impiden que las CGP sigan una trayectoria errónea y no puedan salirse del "túnel" que físicamente las dirigiría hacia la cresta genital.

Aspectos moleculares de las CGP

Hasta la fecha se conocen pocas moléculas que se expresen durante la migración de las CGP hacia las crestas genitales y que pudieran desempeñar un papel importante en la diferenciación de este tipo celular.

La fosfatasa alcalina es una enzima que se ha utilizado como marcador de las CGP para determinar su origen y migración.

La fosfatasa alcalina es una enzima que se ha utilizado como marcador de las CGP para determinar su origen y migración. Esto ha llevado a pensar que la expresión de la fosfatasa alcalina durante la ruta de migración de las CGP desempeña un papel importante en la biología de este tipo celular. Sin embargo, la mutación dirigida del gen que codifica para esta enzima en las CGP ha demostrado que su ausencia no modifica el comportamiento migratorio de estas células (MacGregor y cols. 1995). *Oct-4*, un factor de transcripción que se une a motivos octaméricos, es otra de las proteínas que se expresa en este tipo celular. El papel que desempeña este factor en las CGP aún no se ha determinado; sin embargo, se ha observado que se expresa entre los 8.5 y 12 *dpc* en CGP de ambos sexos, en ovocitos no fertilizados y en células pluripotenciales embrionarias. Por lo tanto, se piensa que es un factor involucrado en mantener la totipotencialidad de células capaces de producir nuevas células germinales (Schöler y cols., 1989). Recientemente, se ha caracterizado un miembro de la familia de factores transformantes β, la proteína de señalización intercelular *Bmp4* (proteína morfogénetica de hueso 4). El papel que desempeña esta proteína se ha relacionado directamente con la determinación de las CGP. *Bmp4* se expresa en el tiempo y el lugar exacto para la inducción de las CGP a partir de precursores localizados en el epiblasto. La mutación dirigida para *Bmp4* demuestra que los embriones homocigotos carecen completamente de CGP (Lawson y cols., 1999).

Durante la vida embrionaria las CGP expresan en su superficie una gran variedad de determinantes antigénicos con una distribución temporal muy específica. A este tipo de moléculas se les ha asociado en el proceso de migración de estas células, como es el caso del antígeno embrionario estado específico-1 (SSEA-1), por ser muy abundante en este tipo celular durante su periodo migratorio y desaparece gradualmente una vez que ya han colo-

nizado la gónada (Gomperts y cols., 1994). Sin embargo, aún no se ha establecido si ésta y otras moléculas relacionadas, realmente tienen un papel funcional en la migración de las CGP.

El receptor tirosina-cinasa *c-kit*, cuyo ligando es el factor *Steel,* es otra de las moléculas que expresan las CGP. Se ha demostrado que la función de este receptor tiene un papel muy importante en la sobrevivencia de las CGP. En observaciones realizadas en ratones mutantes en el *locus white-sppoting* (W), los cuales carecen de CGP o presentan un número muy reducido de éstas, reveló que el proto-oncogén *c-kit* era el que se encontraba mutado. Paralelamente, otra mutación, la del *locus Steel* (Sl), que codifica para el factor de crecimiento Steel, presentaba un fenotipo en las CGP similar al de la mutación del *c-kit* (McCoshen y McCallion, 1975). Al establecerse que *Steel* es el ligando del *c-kit*, se comprendió la similitud de ambos fenotipos, ya que, al no producirse el factor de crecimiento, o al estar mutado su receptor, las CGP no pueden transducir la señal y, por lo tanto, no proliferan y/o son incapaces de migrar.

Además del *Steel*, existen otros factores que promueven la sobrevivencia y/o proliferación de las CGP *in vitro*. En experimentos realizados con el factor transformante beta-1 (TGFβ-1), se ha observado que éste tiene un efecto negativo sobre la proliferación de las CGP (Godin y Wylie, 1991); sin embargo, se desconoce si este factor tiene el mismo efecto *in vivo*. Otra actividad que se la ha postulado al TGFβ-1 es la de ser un agente quimioatrayente que pueda dirigir la migración de estas células hacia la gónada.

La llegada de las CGP a la gónada y la pérdida de sus características migratorias marca el inicio de otra fase del desarrollo de las CGP. Estas células, junto con varios tipos celulares de células somáticas, conforman la cresta genital en la que posteriormente se establecerá la gónada indiferenciada. Varias señales locales habrán de requerirse para que las CGP detengan su actividad migratoria. Sin embargo, hasta el momento no se ha identificado ninguna con precisión. Recientemente, sin embargo, se encontró que un homólogo del gen *Vasa* se expresa en las CGP del ratón en el momento en que se instalan en la cresta genital (Toyooka y cols., 2000).



Establecimiento de la gónada indiferenciada

Origen de las células somáticas

Cuando las CGP empiezan a llegar a la región urogenital, en ésta ya se encuentran diferentes tipos de células somáticas, todas ellas derivadas del mesodermo. Entre ellas se encuentran las mesoteliales, mesenquimáticas, mesonéfricas y endoteliales. Los dos primeros tipos celulares son los que participan en la formación de la gónada indiferenciada como células precursoras; las células mesonéfricas y endoteliales son parte de tejidos ya diferenciados (el mesonefros y el sistema circulatorio, respectivamente) que contribuyen sustancialmente en la morfogénesis de la gónada (figura 23-2).

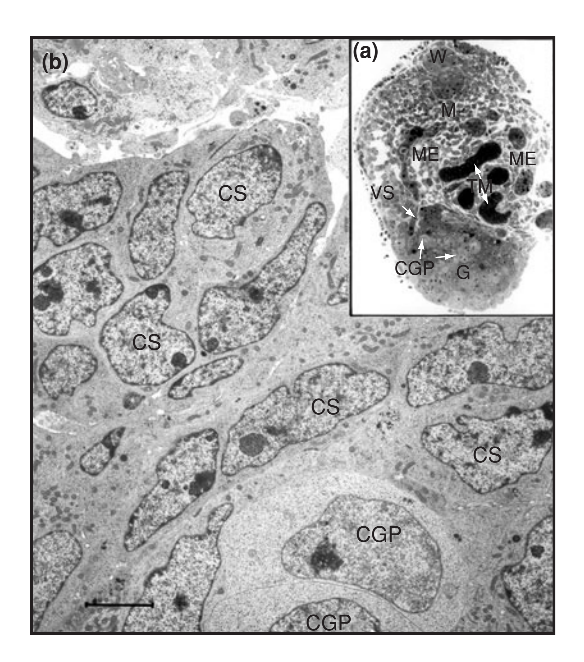


Figura 23-2. a) Corte transversal de la cresta genital de un embrión de ratón de 11 *dpc*. En la región mesonéfrica (M) es evidente el conducto de Wolf (W) y algunos túbulos mesonéfricos (TM) rodeados por células mesenquimáticas (ME). En la cresta genital (G) se observan células germinales primordiales (CGP) distribuidas al azar entre células somáticas de tipo epitelial. Se observa la invasión de un vaso sanguíneo (VS) desde la región mesonéfrica. **b)** Micrografía electrónica de la cresta genital mostrada en la fig. **a.** Las células germinales primordiales (CGP) y las células somáticas (CS) se encuentran dispuestas en forma compacta. En la parte superior se observan algunas células estromáticas de la región mesonéfrica.

El origen de los componentes somáticos ha sido motivo de gran controversia. Brambell y Parkes en 1927, al estudiar el desarrollo de la gónada del ratón, propusieron que las células somáticas se originan por proliferación del epitelio celómico. En otros estudios realizados en varias especies, Zamboni y cols. (1979), en ovejas, Upadhyay y Zamboni (1981), con el ratón, y Wartenberg (1981) con embriones de conejo y humano, sugieren que durante los procesos de diferenciación gonadal las células del mesonefros contribuyen sustancialmente a la estructura del ovario o del testículo. Se postula que la gran mayoría, si no es que en su totalidad, las células epiteliales de los cordones sexuales son derivadas del epitelio de túbulos mesonéfricos.

Las diferencias en los patrones y mecanismos del desarrollo gonadal han sido atribuidas a diferencias específicas en la complejidad estructural, funcionalidad y estado de diferenciación-involución del mesonefros en los diferentes grupos estudiados. Cabe señalar que, durante el desarrollo embrionario, no en todas las especies el mesonefros es funcional. En trabajos realizados con embriones de pollo, Merchant-Larios y cols. (1984) provocaron agénesis unilateral del mesonefros y sugieren que no hay participación de las células epiteliales de este órgano para el establecimiento de los cordones sexuales de la gónada indiferenciada. Sin embargo, las células mesenquimáticas y vasos sanguíneos de la región mesonéfrica invaden la gónada.

Las observaciones realizadas durante el inicio de la formación de la cresta genital en mamíferos, con periodos cortos de gestación, revelan una condensación de células mesenquimáticas; esta condensación lleva a la organización de los túbulos mesonéfricos. La lámina basal del mesotelio es interrumpida en la región de la futura cresta genital, la cual es más densa debido a la estratificación de células mesoteliales. Debido a la gran invasión

de vasos sanguíneos desde la región mesonéfrica, junto con la migración de las CGP hacia la cresta genital, da la impresión de que el crecimiento de las crestas genitales se lleva a cabo por la migración de células provenientes del mesonefros.

Merchant-Larios (1979), en un estudio de autorradiografía de la región urogenital de embriones de rata, demostró que hay una gran actividad de proliferación en tres compartimentos: los túbulos mesonéfricos, mesénquima y mesotelio. Debido a que existe una gran cantidad de muerte celular en el primer compartimento, propone que la morfogénesis de la región genital en mamíferos con periodos cortos de gestación, como el ratón y la rata, se lleva a cabo de la siguiente manera: el canal mesonéfrico induce la organización de los túbulos mesonéfricos. Al mismo tiempo se da una condensación de células epiteliales y mesenquimáticas en el epitelio celómico. Al utilizar el marcador radiactivo, se encontró que las células de este "blastema gonadal" tienen un ciclo más prolongado que las células mesenquimáticas y mesoteliales, lo que se interpreta como una señal de diferenciación temprana.

Como se verá más adelante, estudios recientes en el ratón han demostrado que las células del estroma mesonéfrico participan sustancialmente en la diferenciación gonadal, particularmente en la diferenciación del testículo.

La gónada indiferenciada

En el primordio gonadal se lleva a cabo una diferenciación tisular que antecede a la diferenciación sexual gonadal.

En el primordio gonadal se lleva a cabo una diferenciación tisular que antecede a la diferenciación sexual gonadal. Dicha diferenciación tisular inicial es muy importante, ya que de su correcta comprensión dependerá el entendimiento de los procesos tanto estructurales como moleculares, que conducen a la diferenciación sexual de la gónada. Las células somáticas del primordio gonadal se originan del mesodermo. Inicialmente son de tres tipos: mesenquimáticas (laxamente distribuidas), mesoteliales (del epitelio celómico) y endoteliales (provenientes de los vasos que invaden la zona).

Las células mesenquimáticas y mesoteliales inician una gran actividad proliferativa al llegar las CGP. Después de administrar ^{3}H-t-timidina, un precursor radiactivo del DNA, se detecta una proliferación activa de todas las células somáticas en la región de la cresta genital. Se observa entonces una condensación de células de origen mesotelial y mesenquimático fundamentalmente, de manera que forman un agregado compacto que se denomina "blastema gonadal". A partir de este primordio embrionario, se diferencian dos tejidos gonadales importantes: los cordones sexuales y el estroma. Los cordones sexuales son arreglos epiteliales que se encuentran delimitados por una lámina basal y dentro de ellos encontramos a las CGP. Por otro lado, en el estroma se encuentran células de tipo mesenquimático y vasos sanguíneos que irrigan a la gónada indiferenciada. Cabe mencionar la presencia de algunos túbulos del mesonefros vecino, que desde esta etapa inicial mantienen estrecha relación con la gónada (figura 23-2).

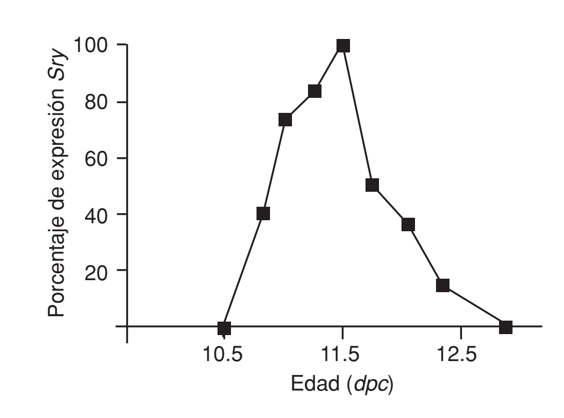


Figura 23-3. Relación del porcentaje de expresión del *Sry* durante el establecimiento y diferenciación de la gónada en el ratón. El *Sry* se detecta a partir de los 10.5 *dpc*, alcanzando su etapa de máxima expresión a los 11.5 *dpc* y decayendo cuando se inicia la diferenciación morfológica del testículo (12.5 *dpc*) modificada de Hacker y cols., (1995).

Por lo tanto, el estado indiferenciado de la gónada corresponde a la colonización de la cresta gonadal por parte de las CGP, y a la proliferación de células somáticas de la región urogenital, que darán origen tanto al tejido epitelial como al tejido estromático, que constituyen, a su vez, los elementos histológicos precursores del ovario o del testículo en hembras o machos, respectivamente.

En estas etapas tempranas del desarrollo del ratón, 11 *dpc*, las gónadas de ambos sexos son morfológicamente idénticas, pero en el caso de los machos genéticos ya existe una diferenciación de la gónada a nivel molecular. Es decir, a partir de los 10.5 *dpc* se inicia la expresión del factor determinante del testículo, denominado *Sry* en ratón (Koopman y cols., 1990; Hacker y cols., 1995) y *SRY* en humanos (Berta y cols., 1990) y se continúa hasta los 12.5 *dpc*, momento en el cual se inicia la diferenciación histológica del testículo (figura 23-3).

En etapas tempranas del desarrollo del ratón, las gónadas de ambos sexos son morfológicamente idénticas, pero en los machos genéticos ya existe una diferenciación de la gónada a nivel molecular.

Este gen reúne todas las propiedades biológicas y genéticas esperadas del gen determinante de la diferenciación testicular. En el caso del ratón, su identidad se confirmó plenamente al transferir el gen *Sry* hacia animales transgénicos. Aunque el *SRY* consiste en una secuencia de 35 kb en humanos, un fragmento de sólo 14 kb del *Sry* del ratón fue capaz de inducir la formación de testículos en hembras genéticas (Koopman y cols., 1991). Como se sabe que el gen *Sry* codifica para una proteína que se asocia al DNA, se asume que su acción es intracelular y no se difunde. Por lo tanto, es probable que controle la expresión de otros genes en la misma célula, modificando así su comportamiento fisiológico. Dicha modificación pudiera ser la producción de un factor o factores responsables de los diversos cambios morfogenéticos necesarios para la diferenciación del testículo a partir de la gónada indiferenciada.

El factor determinante del testículo, se denomina *Sry* en ratón y *SRY* en humanos.

Después de la identificación del *SRY*/*Sry* se han caracterizado otros genes, que probablemente participan en el desarrollo gonadal. El gen *Wt-1*, un factor de transcripción por sus dominios de dedos de cinc y regiones ricas en prolinas y glutaminas, es un buen candidato. Las evidencias de que *Wt-1* es importante para el desarrollo gonadal se desprenden de estudios realizados en humanos. Individuos heterocigotos con malformaciones genitales presentan mutaciones en el gen *Wt-1* (Hastie, 1992). En estudios realizados por Armstrong y cols. (1992) en el ratón, se demostró que el si-

tio predominante de expresión de este gen en el embrión está confinado al riñón y la gónada. Su expresión se detecta primero a los nueve *dpc* y es más evidente a los 12 *dpc*; en esta etapa, en individuos homocigotos a la mutación de *Wt-1*, se detiene el desarrollo gonadal. Posteriormente a los 12.5 *dpc* no se detecta presencia de tejido gonadal (Kreidberg y cols., 1993), lo cual sugiere que la expresión de *Wt-1* está involucrada en algunas vías que llevan a la transformación de las células mesenquimáticas dentro de células epiteliales, las cuales más tarde darán origen a las células precursoras de Sertoli.

Existe la posibilidad de que *Wt-1* actúe como un factor de transcripción regulando la expresión del *Sry*. No obstante, la expresión temprana de *Wt-1* a los nueve *dpc* y su distribución en el complejo urogenital sugieren que otros genes pudieran estar involucrados durante el establecimiento y diferenciación de la gónada.

El factor esteroidogénico 1 (SF-1) inicialmente se aisló como un regulador de la expresión de hidroxilasa en células corticales de la adrenal y células de Leydig. Sin embargo, en estudios más recientes su expresión se detecta entre los 9 y 9.5 *dpc* en la cresta genital tanto de machos como de hembras. Entre los 12.5 y 15 *dpc*, los niveles de expresion de SF-1 se detectan más altos en los cordones testiculares y, en el caso del ovario, la señal es más debil. Estos resultados demuestran que SF-1 se expresa en la gónada bipotencial, lo cual sugiere que este gen puede desempeñar un papel importante durante las etapas tempranas del desarrollo gonadal.

En estos mismos estudios se realizó mutación dirigida del gen *Ftz-F1*, el cual codifica para SF-1, y se observó que todos los ratones deficientes de SF-1 muestran genitales internos y externos de hembra y no hay presencia de tejido gonadal o glándulas adrenales independientemente de la presencia del cromosoma Y. A los 10.5 *dpc*, la cresta genital se observa con apariencia normal, aunque la región de la gónada es más pequeña comparada con los animales normales. A los 12.5 *dpc*, el tejido gonadal es escaso y las pocas células que permanecen muestran características de células apoptóticas. Estas características sugieren que el SF-1 actúa de una manera similar a *Wt-1* (Kreidberg y cols., 1993). En base a esto, es probable que SF-1 active la expresión de otros genes durante el desarrollo gonadal temprano.

El gen *ZFY* (*zinc-finger gene on the Y chromosome*) inicialmente se identificó como el factor determinante del testículo (TDF) por presentar un dominio similar a los comunicados en factores de transcripción, sugiriendo que la proteína se unía específicamente al DNA, regulando la transcripción de otro gen en la vía que conduce a la diferenciación de la gónada masculina. Sin embargo, en los años subsecuentes se acumularon una serie de evidencias que excluyeron a *ZFY* como TDF; Koopman y cols., 1990; Palmer y Burgoyne, 1991).

Posteriormente, se descubrieron cuatro genes homólogos a *ZFY* en el ratón: *Zfy-1* y *Zfy-2* localizados en el cromosoma Y, *Zfx* en el cromosoma X y *Zfa* en el cromosoma 10 (Koopman y cols., 1991). El patrón de expresión

de estos genes ha sido parcialmente determinado. *Zfx* es expresado en todos los órganos examinados, mientras que los otros miembros de esta familia presentan un patrón de expresión más restringido. *Zfa* sólo se expresa en el testículo adulto. *Zfy*-1 y *Zfy-2* se expresan en células germinales del testículo adulto.

En estudios realizados por Zambrowicz y cols. (1994) observaron que *Zfy-1* se expresa en la cresta genital tanto de machos como de hembras, iniciando entre los 10 y 11 *dpc*, aumentando entre los 12 y 13 *dpc* y disminuyendo hacia los 15 *dpc*. Su expresión en la cresta genital se restringe a las células somáticas, probablemente en las mismas células donde se expresa el *Sry*, células precursoras de las células de Sertoli del testículo adulto y células de la granulosa del ovario adulto. Esto sugiere que *Zfy-1* y *Sry* pueden ser similares y unirse a algunos factores de transcripción similares.

Los genes *Hox*, los cuales presentan secuencias conservadas de DNA y se han relacionado con mutaciones homeóticas y de segmentación en *Drosophila*, también se han detectado en el genoma de los vertebrados. Los genes caracterizados hasta este momento en el ratón se han agrupado en cuatro complejos: HOX-1, HOX-2, HOX-3 y HOX-5, localizados sobre los cromosomas 6, 11, 15 y 2, respectivamente. El patrón de expresión de estos genes se ha estudiado por hibridación *in situ* y la observación general es que la transcripción de los genes *Hox* se inicia muy temprano en el desarrollo desde los 7.5 *dpc*.

Featherstone y cols., (1988) clonaron cuatro genes pertenecientes al complejo HOX-5 y mostraron que éste contiene tres homeogenes: *Hox-5.1, Hox-5.2* y *Hox-5.3*. Estudiando los dominios de expresión tanto de *Hox-5.2* y *Hox-5.3* se encontró que ambos se encuentran en el sistema nervioso central y en células mesenquimáticas del esbozo de las extremidades en etapas tempranas del desarrollo (9 *dpc*). Sin embargo, *Hox-5.2* es expresado específicamente en gónadas de machos y hembras desde los 10 *dpc* en las células somáticas. A los 12 *dpc* en el caso de los machos, la marca se detecta en la corteza, mientras que en los cordones seminíferos es negativa. En el caso del ovario, el patrón de hibridación se encuentra distribuido completamente en la corteza ovárica. La expresión de *Hox-5.2* permanece en las células somáticas de machos y hembras en la edad adulta y, en el caso de los machos, es restringida a las células de Leydig. Estas observaciones sugieren que la proteína *Hox-5.2*, además de su probable papel posicional en el eje rostro-caudal, pudiera estar involucrada en otros procesos tales como la regionalización de la especificación del tipo celular durante la diferenciación gonadal, así como durante procesos inductivos o de determinación del linaje celular.

Los estudios en humanos que muestran diferentes tipos de reversión sexual ha sido uno de los caminos más exitosos para el hallazgo de genes importantes para el desarrollo sexual. El análisis de mutaciones de pacientes que presentan displasia campomélica, un síndrome de malformación de los huesos y reversión sexual, indica que un gen relacionado con el *SRY*, el *SOX9,* se encuentra involucrado con el desarrollo de los huesos y la determinación del sexo.

Para establecer el papel del *SOX9* en la determinación del sexo en los vertebrados, Kent y cols. (1996) analizaron su patrón de expresión durante el desarrollo de las gónadas en el ratón. El mRNA de *Sox9* se encontró en las crestas genitales de los machos (10.5 *dpc*), pero no en las hembras; su distribución se observa en los cordones sexuales de los testículos en desarrollo. En el caso de las hembras, el mRNA de *Sox9* no se detecta por hibridación *in situ* después de los 10.5 *dpc*, aunque se detectó con una técnica más sensible (RT-PCR), lo que sugiere que los transcriptos de Sox9 se encuentran presentes en las hembras, pero en menor cantidad.

CGP purificadas no expresan *Sox9*, por lo que su expresión se restringe a las células de Sertoli. El patrón de expresión se mantiene en el testículo durante la vida fetal y adulta y también se detecta en células que rodean a los conductos müllerianos y en el epidídimo. El tiempo y especificidad del tipo celular de expresión de Sox9 sugiere que puede ser regulado por el *Sry*. Al ser *Sox9* un factor de transcripción con un motivo de unión al DNA es probable que active genes involucrados en el desarrollo testicular.

El cromosoma X también se ha implicado en la determinación del sexo con la identificación de individuos con reversión sexual de macho a hembra, los cuales acarrean duplicaciones del brazo corto del cromosoma X (Xp). Los genes que se localizan en esta región duplicada escapan a la inactivación de uno de los cromosomas X, como es el caso de los machos 47,XXY, y por lo tanto, están presentes en una dosis doble y funcional. La región duplicada de Xp parece contener un gen (o genes) que interfieren con la formación del testículo cuando su producto está presente al doble del nivel normal —el *locus* se denominó DSS (reversión sexual sensible a la compensación génica)—. El DSS se ha mapeado para una región de 160 kb del cromosoma humano Xp21, el cual incluye el *locus* de la hipoplasia congénita adrenal (AHC). Aunque éste puede interferir con la determinación testicular cuando está duplicado, no es esencial para la diferenciación del testículo. Sin embargo, puede ser requerido para el desarrollo del ovario y para promover tanto la diferenciación de células ováricas como para reprimir la diferenciación de tipos celulares testiculares.

Un gen aislado del *locus* DSS (DAX-1) se encontró que codifica para un nuevo miembro de la familia de receptores de hormonas nucleares. La expresión de Dax1 se detecta primero en las células somáticas de la cresta genital a los 11.5 *dpc* tanto en machos como en hembras. Los niveles de expresión decrecen conforme se forman los cordones testiculares (12.5 *dpc*). En el caso de las hembras, Dax1 continúa expresándose en la gónada después de los 12.5 *dpc*, y a los 14.5 *dpc* la señal es restringuida a la región proximal del ovario con el mesonefros.

En el testículo, Dax1 se detecta en las células de Leydig. En el ovario, la señal se detecta en células del estroma, las cuales incluyen a células de la teca.

La expresión de Dax1 a los 11.5 *dpc* en ambos sexos sugiere que no está directamente reprimido por el *Sry*. Sin embargo, el *Sry* pudiera estar interfiriendo con la actividad de Dax1 más que con su expresión. Las células positivas para Dax1 muestran una distribución dentro de las gónadas que no se había observado previamente, lo que se puede interpretar como un

Tabla 23-1. Genes que se expresan al inicio del desarrollo gonadal del ratón.

	9.5 *dpc*		10.5 *dpc*		11.5 *dpc*		12.5 *dpc*		13.5 *dpc*		14.5 *dpc*	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
WT-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HOX-5.2	?	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZFY-1	?	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sry	–	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–
SF-1	+	+	+	+	+	+	+	∓	+	∓	+	–
SOX-9	?	?	+	∓	+	–	+	–	+	–	+	–
DAX 1	?	?	?	?	+	+	∓	+	∓	+	–	+
MIS	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–	+	–
3BHSD	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–	+	–
P45017∝	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–
	Gónada indiferenciada						Diferenciación sexual					

marcador de células indiferenciadas. Estas células desaparecen rápidamente en el testículo y permanecen por más tiempo en el ovario, especialmente en una región adyacente al mesonefros. Esta interpretación es consistente con la propuesta de que el *Sry* inicia la diferenciación de la cresta genital hacia el testículo, en el cual se reprime la expresión de Dax1 (tabla 23-1).



Diferenciación celular y morfogénesis gonadal

Diferenciación del testículo

En los mamíferos, la primera manifestación estructural de la diferenciación sexual se detecta en la gónada de los machos. En el caso del ratón, los primeros indicios de diferenciación se observan alrededor del día 12.5 *postcoitum* (figura 23-4).

> En los mamíferos, la primera manifestación estructural de la diferenciación sexual se detecta en la gónada de los machos.

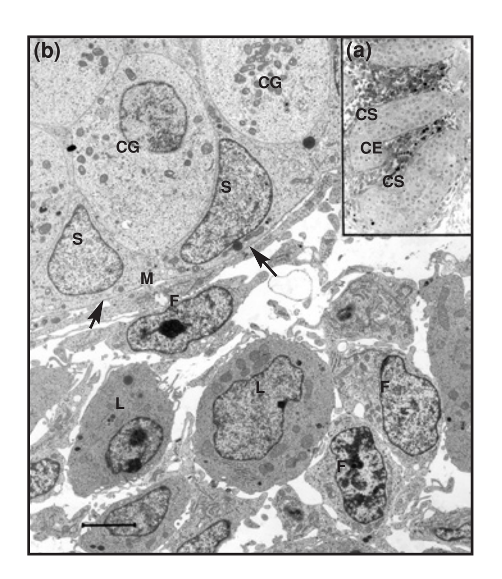


Figura 23-4. a) Testículo de ratón a los 14.5 *dpc*. Es evidente la formación de los cordones seminíferos (CS) separados del compartimento estromático (CE). **b)** A nivel del microscopio electrónico se observan células germinales (CG) y células de Sertoli (S) dentro de un cordón seminífero delimitado por una lámina basal (flechas). En el compartimento estromático encontramos células mioides todavía poco diferenciadas (M), así como fibroblastos (F) y células de Leydig (L) bien diferenciadas.

La diferenciación del testículo se inicia cuando los cordones sexuales se separan del epitelio celómico como consecuencia de los arreglos producidos por una invasión de mesénquima y vasos sanguíneos que provoca la compactación de los cordones, ahora denominados “cordones testiculares”. El traslado de los cordones sexuales a la región medular de la gónada es un movimiento morfogenético que implica cambios en la adhesividad de las células epiteliales y un activo depósito de las moléculas que forman la lámina basal (laminina y colágena, principalmente). Las células que rodean a los cordones testiculares se aplanan en forma paralela a la lámina basal. Estas células, al diferenciarse, se les denomina células mioides, que son las encargadas de la formación de las membranas basales. Ultraestructuralmente se caracterizan por tener un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado y, en el espacio extracelular adyacente a éstas, se observa gran cantidad de material fibrilar como colágena y fibronectina (Paranko y cols., 1983).

Las células del epitelio interno, es decir, las células de Sertoli, tienen dos funciones principales: el empaquetamiento de las CGP y la síntesis de la hormona antimülleriana (Josso y cols., 1977), responsable de la regresión de los conductos Müllerianos. Las células de Sertoli forman un epitelio de tipo columnar y presentan prolongaciones citoplásmicas que rodean a las CGP. Estas células sólo proliferan durante la etapa fetal y por un corto tiempo en el periodo posnatal.

La síntesis de la hormona inhibidora de los conductos müllerianos, o sustancia inhibidora de los conductos müllerianos (MIS), es secretada específicamente por las células de Sertoli en testículos fetales y adultos (Cate y cols., 1990). La MIS es un miembro de la familia de los factores de crecimiento transformante-β (TGF-β) y es la primera sustancia secretada por las células de Sertoli durante su diferenciación. En el ratón, MIS es primero detectada por hibridación *in situ* en testículos fetales a los 12.5 *dpc* y su expresión es independiente de la presencia de CGP (Münsterberg y Lovell-Badge, 1991).

El tiempo y localización de expresión de MIS correlacionado con la expresión del *Sry* sugiere que el *Sry* podría expresarse en las células de Sertoli para llevar a cabo su diferenciación y todos los demás sucesos del desarrollo del testículo son dirigidos por las células de Sertoli; con base en esto, el *Sry* podría estar regulando el inicio de la expresión de MIS. En gónadas fetales de rata, se ha encontrado que el producto del *Sry* interactúa con los promotores de MIS y de P450-aromatasa y se ha propuesto que la regulación de estos dos genes directamente controlan la diferenciación de la gónada hacia el testículo.

Las células del estroma que rodean a los cordones testiculares se diferencian para formar varios tipos celulares: las células miodes, fibroblastos, endotelios y células de Leydig, que son las más importantes por su actividad endocrina.

Las células de Leydig se diferencian a partir del tejido intersticial y son las encargadas de la síntesis de andrógenos en el testículo.

Las células de Leydig se diferencian a partir del tejido intersticial y son las encargadas de la síntesis de andrógenos en el testículo. Estas células se diferencian poco tiempo después de la diferenciación de los cordones testiculares. En el ratón, la diferenciación de las células de Leydig se hace

evidente a partir de los 14 *dpc*; se caracterizan por presentar gran cantidad de mitocondrias de crestas tubulares, organelos característicos de células productoras de esteroides. También se observa, a partir de este momento, un gran desarrollo del retículo endoplásmico liso, aparición de gotas lipídicas e inclusiones de glucógeno en su citoplasma (Russo y De Rosas, 1971).

El origen de este tipo celular es muy controvertido; algunos autores proponen que su diferenciación es a partir del tejido mesenquimático, pero otros sustentan que tienen el mismo origen que las células del epitelio interno e inclusive se ha llegado a postular un doble origen.

Papel del mesonefros en la diferenciación testicular

Durante los procesos de diferenciación gonadal, las gónadas de ambos sexos se encuentran en íntima asociación con el mesonefros. Debido a esta asociación, se ha propuesto que este órgano desempeña un papel importante durante el desarrollo de la gónada. Además de postular la existencia de un factor mesonéfrico, algunos autores sugieren que, al inicio del desarrollo gonadal, las células del mesonefros participan sustancialmente, por lo que se ha atribuido un origen mesonéfrico a las células somáticas de la gónada.

Durante los procesos de diferenciación gonadal, las gónadas de ambos sexos se encuentran en íntima asociación con el mesonefros.

Si las células de la región mesonéfrica están participando en el desarrollo gonadal, una pregunta importante sería, ¿qué tipo de células? Empleando la técnica de cultivo de órganos, se estudió la diferenciación sexual de la gónada indiferenciada (11.5 *dpc*) con y sin el mesonefros adyacente. Se observó que la diferenciación de células de Sertoli y Leydig es independiente de la presencia de células mesonéfricas; sin embargo, la formación de los cordones seminíferos requiere la presencia de células provenientes del mesonefros. Se identificaron células endoteliales y mioides pericordonales, ambas de origen mesonéfrico, como las responsables de la organización de los cordones seminíferos (Merchant-Larios y cols., 1993). En base a estos resultados se propone que las células del estroma, desde la región mesonéfrica, pueden deberse a una señal que viene de las células de la región de la gónada, probablemente controladas por el *Sry*.

Cultivando gónadas junto con el esbozo de la extremidad anterior (EEA) del mismo embrión, se observó que las células estromáticas del EEA migraron también hacia la región de la gónada y se llevó a cabo la formación de los cordones seminíferos (figura 23-5). Esto sugiere que las células del estroma mesonéfrico no son específicas para llevar a cabo la diferenciación histológica del testículo, por lo que es claro que ambos tejidos primordiales embrionarios responden a la misma señal producida por las células de la cresta gonadal a los 11.5 *dpc* (Moreno-Mendoza y cols., 1995).

Por lo tanto, es claro que la invasión de células mesenquimáticas hacia la región de la gónada, en etapas tempranas, es necesaria para la diferenciación histológica de los cordones seminíferos. Sin embargo, la diferenciación de células de Sertoli y Leydig parece ser independiente de la migración de células mesonéfricas, lo que sugiere que las precursoras de estas células están ya presentes en la cresta genital desde estapas muy tempranas.

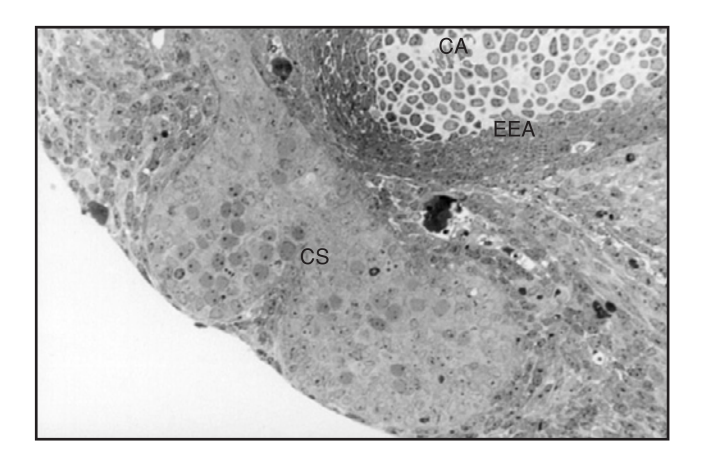


Figura 23-5. Gónada indiferenciada de macho de 11 *dpc* injertada al esbozo de la extremidad anterior (EEA) y cultivada 96 h. Se observa la formación de un cordón seminífero (CS) rodeado por estroma probablemente derivado del tejido del EEA. En la parte superior puede verse cartílago (CA) bien diferenciado.

En estudios recientes, gónadas aisladas de macho en etapas indiferenciadas se injertaron con mesonefros proveniente de embriones transgénicos, portadores del gen Lac-z de origen bacteriano. En estos ratones todas las células acarrean el gen y los tejidos al ser incubados en un sustrato de x-gal producen un color azul en todas las células que expresan el Lac-z. De esta manera, se corroboró que células mesonéfricas migran hacia la región de la gónada y a nivel ultraestructural se observó que estas células tienen la capacidad para diferenciarse como células de Leydig.

Otros genes autosómicos en la determinación testicular

El factor determinante del testículo presente en el cromosoma Y (*Sry*) es necesario, pero no suficiente, para la diferenciación del testículo.

El factor determinante del testículo presente en el cromosoma Y (*Sry*) es necesario, pero no suficiente, para la diferenciación del testículo. Aunque a ciencia cierta no se conocen los genes que probablemente estén regulados por el *Sry*, estudios realizados en ratón demuestran que este gen parece coordinarse con ciertos genes autosómicos. Eicher y Washburn (1983) observaron que, cuando el cromosoma de *Mus domesticus* fue introducido al genoma de la cepa C57BL/6J, en su progenie (B6.Y*dom*), individuos XY desarrollan ovarios. La mitad de estos ratones XY presentan una reversión sexual completa (presentan sólo tejido ovárico) y la otra mitad de este grupo presentan tanto tejido testicular como ovárico. El gen determinante del testículo del cromosoma Y de cada cepa puede cooperar con sus propios genes autosómicos determinantes del testículo, y es posible que el producto de estos genes sea expresado en diferentes tiempos entre las dos cepas (Palmer y Burgoyne, 1991)

Otro gen autosómico que participa en la determinación del sexo es el conocido como el gen de reversión sexual asociado al testículo (*Tas*). Este gen se segrega del complejo génico T/t en el cromosoma 17 de *Mus musculus*, y se han encontrado diferentes alelos de este gen en diferentes cepas de ratones (Washburn y Eicher, 1989). Las cepas C57 y AKR de *M. musculus* desarrollan testículos en 50%; sin embargo, el cromosoma Y de AKR es incapaz de dirigir la morfogénesis testicular si el cromosoma 17 viene de la cepa C57. En estos casos, la determinación testicular normal es interrum-

pida y las gónadas presentan una mezcla de tejido ovárico y testicular. Sin embargo, se desconoce cómo estos genes interactúan con el *Sry*.

Por otro lado, McElreavey y cols. (1993) postulan la existencia de un gen Z, cuya actividad inhibe la diferenciación testicular y estimula la formación de ovarios. La postulación de este gen se desprende de observaciones realizadas en humanos, donde se ha observado la presencia de hembras XX con una translocación del *SRY* (XX,SRY+) e individuos machos con una deleción del *SRY* (XX, SRY-). Se sugiere que la proteína del *SRY* inhibe el gen Z (o su producto), dirigiendo la diferenciación hacia el testículo. En el caso de los machos XX que carecen de *SRY*, se postula que el gen Z es mutado, por lo que el fenotipo testicular se lleva a cabo. En las hembras XY con *SRY*, el gen Z podría ser insensible a los efectos inhibitorios de la proteína del *SRY*, de tal manera que el gen Z está activo, expresándose el fenotipo ovárico.



Diferenciación del ovario

En etapas tempranas de la diferenciación gonadal del ratón, el ovario no muestra cambios con respecto a la estructura de gónada indiferenciada, sólo se puede observar un cierto crecimiento debido a la proliferación de células somáticas y germinales a los 12.5 *dpc* (figura 23-6).

La diferenciación y morfogénesis del ovario se inicia tardíamente con respecto a la diferenciación del testículo. Las CG en el ovario (ovogonias) inician un periodo de proliferación activa que termina con el inicio de la meiosis (14.5 *dpc*). Las ovogonias presentan puentes citoplásmicos, que tienen una función muy importante en la sincronización de la meiosis (Gondos, 1984).

> La diferenciación y morfogénesis del ovario se inicia tardíamente con respecto a la diferenciación del testículo.

El ratón presenta lo que se denomina meiosis inmediata, es decir, que se inicia un poco después de la diferenciación sexual de la gónada. Entre los

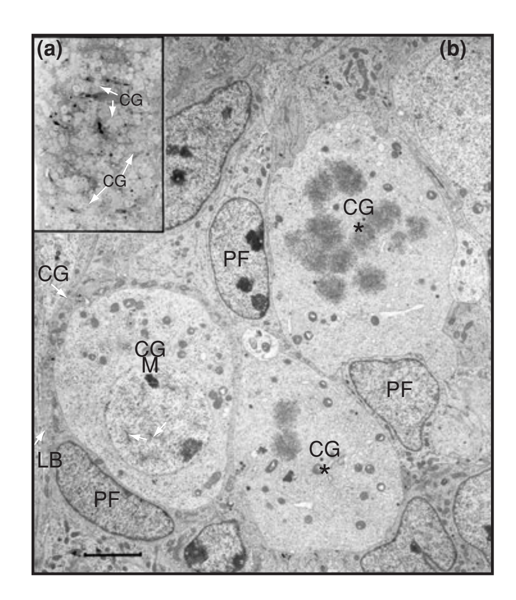


Figura 23-6. a) Corte semifino de ovario de ratón de 14.5 *dpc*. Se observa una gran cantidad de células germinales (CG), las cuales, junto con las células epiteliales y estromáticas, forman una estructura compacta. **b)** Al microscopio electrónico se detectan CG en mitosis (*) o en meiosis (M). En éstas se aprecian los complejos sinaptinémicos (flechas). Son evidentes varias células somáticas prefoliculares (PF) y, por fuera de la lámina basal (LB), hay células del estroma.

13 y 14 *dpc* se observan ovocitos en las primeras etapas de la profase I de la división meiótica. En éstas se observan en el núcleo hebras finas de cromatina unidas a la membrana nuclear. Entre los 15 y 16 *dpc*, la mayoría de los ovocitos se encuentran en etapas de cigoteno y paquiteno, esta última representada por la presencia de complejos sinaptinémicos, formados por el acoplamiento de los cromosomas homólogos. Es durante estas dos etapas cuando ocurre un proceso de degeneración de algunos ovocitos.

Iniciada la meiosis, principia a su vez el proceso de foliculogénesis, que normalmente se define como la formación de folículos primordiales en el ovario de los mamíferos. Los ovocitos se individualizan al ser rodeados por células foliculares y una lámina basal. Dicha individualización se realiza a partir de los cordones sexuales u ovígeros, cuando los ovocitos empiezan a ser separados por células epiteliales precursoras de las foliculares (Merchant-Larios, 1984). El proceso de foliculogénesis se divide en tres etapas (Merchant-Larios y Chimal-Monroy, 1989):

I. Los ovocitos se encuentran agrupados, haciendo contacto directo entre sí en el interior de los cordones sexuales.

II. Los ovocitos son separados dentro de los cordones por las células epiteliales.

III. Los ovocitos y las células prefoliculares rodeadas por una lámina basal son separados por células del estroma.

La formación de folículos primordiales es dependiente de la presencia de ovocitos. Su ausencia impide que los folículos se formen en el ovario (Merchant-Larios, 1976). Conforme crecen los folículos primordiales, se diferencian varios tipos celulares. Primero aparece la teca interna, formada por células mioides, fibroblastos y células esteroidogénicas. Por fuera de la teca interna, se forma la teca externa formada por tejido conectivo fibroso. Estos tipos celulares hacen del folículo una unidad funcional.

La mayoría de los folículos sufren el proceso de atresia folicular, que parece desempeñar un papel importante en la diferenciación del tejido intersticial esteroidogénico del ovario conocido con el nombre de glándula intersticial. La atresia folicular ocurre en cualquier momento de la vida del organismo y parece ser que algunas células de la teca interna que rodean al epitelio folicular se hipertrofian y forman pequeños cúmulos de células esteroidogénicas localizadas en el estroma.



Interacción entre las CGP y somáticas en el desarrollo gonadal

Si las CGP son eliminadas durante las etapas iniciales del desarrollo de la gónada por cualquier causa (genética, farmacológica, física, etc.), se ha observado que la gónada indiferenciada se establece normalmente.

En estudios realizados por Merchant y Centeno (1981), observaron la ultraestructura de las células somáticas y germinales en la gónada indiferenciada de ratas después de la administración de busulfán (agente quelante cuya actividad citotóxica se debe a su capacidad para reaccionar con

el DNA y algunas proteínas). Se ha demostrado que esta droga destruye selectivamente a las CGP, las cuales se encuentran en etapas muy tempranas de citodiferenciación. Utilizando una sola dosis de busulfán, se observa que el proceso de diferenciación sexual también tiene lugar en las gónadas estériles.

Desde el punto de vista funcional, los testículos secretan normalmente los factores necesarios para la diferenciación sexual del tracto y de los genitales externos. En las hembras, sin embargo, la ausencia de las CGP provoca alteraciones en la diferenciación funcional del ovario, lo que a su vez se refleja en una alteración del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Cuando un pequeño número de folículos son formados debido a la sobrevivencia de algunas CGP, éstos generalmente sufren atresia durante la etapa prepúber, dando lugar a una gran masa de tejido esteroidogénico en el ovario (Merchant-Larios, 1976).

Probablemente, la diferencia importante que tienen las CGP en los machos y en las hembras se deba a que los procesos de morfogénesis que siguen los testículos y ovarios a partir de la gónada indiferenciada son distintos. Como se describió anteriormente, el testículo se diferencia muy precozmente, de manera que, tanto las células de Sertoli como las de Leydig, inician su actividad secretora cuando las "proespermatogonias", descendientes de las CGP, entran en un periodo de reposo mitótico.

En los ovarios, en cambio, las primeras células que se diferencian son las ovogonias que se transforman en ovocitos al iniciar la meiosis. El inicio del reposo mitótico en los machos coincide con el inicio de la meiosis en el ovario. Esto ha llevado a pensar que en el testículo existe algun factor o factores que están inhibiendo el inicio de la meiosis embrionaria en las CGP. Upadhyay y Zamboni (1982) encontraron que las CGP que quedan atrapadas en la región de la glándula suprarrenal entran en meiosis sin importar el sexo genético del individuo, e incluso que éstas llegan a presentar características morfológicas similares a ovocitos primarios. Con base en lo anterior, sugieren que en la gónada debe de existir algún factor inhibidor de la meiosis.

Debido a la interacción entre las CGP y las células de Sertoli dentro de los cordones seminíferos, se ha postulado que las células de Sertoli sintetizan un factor inhibidor del inicio de la meiosis embrionaria que parece coincidir con la entrada en reposo mitótico (Dolci y DeFelici, 1990). Burgoyne (1988) propone que el *Sry* se expresa en las células de Sertoli para llevar a cabo su diferenciación; por lo tanto, en las células precursoras de Sertoli, el *Sry* podría regular la expresión de un factor que inhibe la profase de la primera división meiótica en las células germinales.

En estudios recientes se está tratando de establecer si las células de Sertoli son capaces de inhibir el inicio de la meiosis en CGP XX. Utilizando la técnica de disgregación-reagregación en cultivos de órganos (Escalante y Merchant-Larios, 1992), se mezclaron gónadas provenientes de embriones de ambos sexos en la etapa indiferenciada (11 *dpc*). Analizando estos reagregados, se observa que las CGP XX, son capaces de formar parte de los cordones

testiculares e interactuar con las células de Sertoli. Sin embargo, a los 11 *dpc* parecen ya estar determinadas para iniciar la meiosis y que la cercanía con las células de Sertoli no tiene ningun efecto sobre este proceso. Otra explicación es que en las CGP XY existieran receptores a algún factor secretado por las células de Sertoli que inhibiera el inicio de la meiosis y, por lo tanto, las CGP XX, al no tener estos receptores, no responden a la señal que viene de las células de Sertoli.

Determinación sexual secundaria

Como se mencionó, la determinación sexual primaria se refiere a la diferenciación de la gónada, ya sea en un ovario o en un testículo. Esto, sin embargo, no da el fenotipo sexual completo. La determinación sexual secundaria involucra el desarrollo de los fenotipos macho y hembra, dependiendo de las hormonas elaboradas por los ovarios y los testículos. La mayoría de los procesos que llevan a la diferenciación sexual secundaria ocurren en el embrión durante la organogénesis.

En experimentos realizados por Jost en la década de 1940, al castrar fetos de conejo *in utero* en la etapa indiferenciada, él observó que los genitales internos y externos se diferenciaban en estructuras de hembra. Asimismo, al trasplantar un testículo al feto castrado, con o sin ovarios, los genitales se transformaron en órganos masculinos y finalmente cuando el testículo fue sustituido por un cristal de testosterona, aunque los genitales externos se masculinizaron los internos permanecieron hermafroditas. Estos resultados llevaron a la postulación de dos importantes conceptos:

1. Los conductos genitales internos y el seno urogenital (genitales externos), tienden “espontáneamente” a diferenciarse como femeninos.
2. Además de la testosterona, que induce la masculinización del canal de Wolff, se requiere de otro factor para la masculinización normal de los genitales internos.

Las estructuras primordiales del tracto genital que darán origen a los genitales internos incluyen dos sistemas de conductos presentes en embriones de ambos sexos: los conductos wolffianos (o mesonéfricos) y los conductos de Müller (o paramesonéfricos). En cambio, los genitales externos se desarrollan a partir de un primordio común (tubérculo genital, pliegues genitales y engrosamientos labioescrotales).

La formación del fenotipo del macho es el resultado de la secreción de hormonas testiculares que promueven el desarrollo de los conductos de Wolff y la regresión de los conductos müllerianos. La primera de estas hormonas es la hormona anti-mülleriana (HAM) que causa la regresión de los conductos müllerianos, proceso que se inicia a los 13.5 *dpc*, y se detecta su sitio de expresión en las células de Sertoli (Münsterberg y Lovell-Badge, 1991).

Inmediatamente despúes de iniciada la síntesis de la HAM, las células intersticiales del testículo fetal se citidiferencian en células de Leydig. Estas células servirán como sustrato anatómico para la producción de testosterona que es la segunda hormona fetal que participa en la construcción del fenotipo masculino. Esta es biotransformada en 5α-dihidrotestosterona para llevar a cabo la diferenciación del conducto de Wolff en epidídimo, vías deferentes y vesícula seminal.

La ausencia embrionaria de testículo y, por lo tanto, de sus productos de secreción, conduce al desarrollo fenotípico femenino. Esta observación, aunada a la actividad esteroidogénica limitada del ovario fetal, indica que la diferenciación genital hacia hembra es un proceso pasivo. La ausencia de la HAM permite el desarrollo de los conductos müllerianos en trompas de Falopio, útero y la porción superior (mülleriana) de la vagina. Por otra parte, la ausencia de testosterona y dihidrotestosterona da como resultado la regresión de los conductos wolffianos y la feminización de los genitales externos.

Los genitales externos femeninos exhiben muy poca diferenciación comparados con los primordios genitales; así, el tubérculo genital da lugar al clítoris, los engrosamientos genitales a los labios mayores y los pliegues a los labios menores. Por otra parte, la porción inferior de la vagina resulta de la invaginación del seno urogenital (figura 23-7).

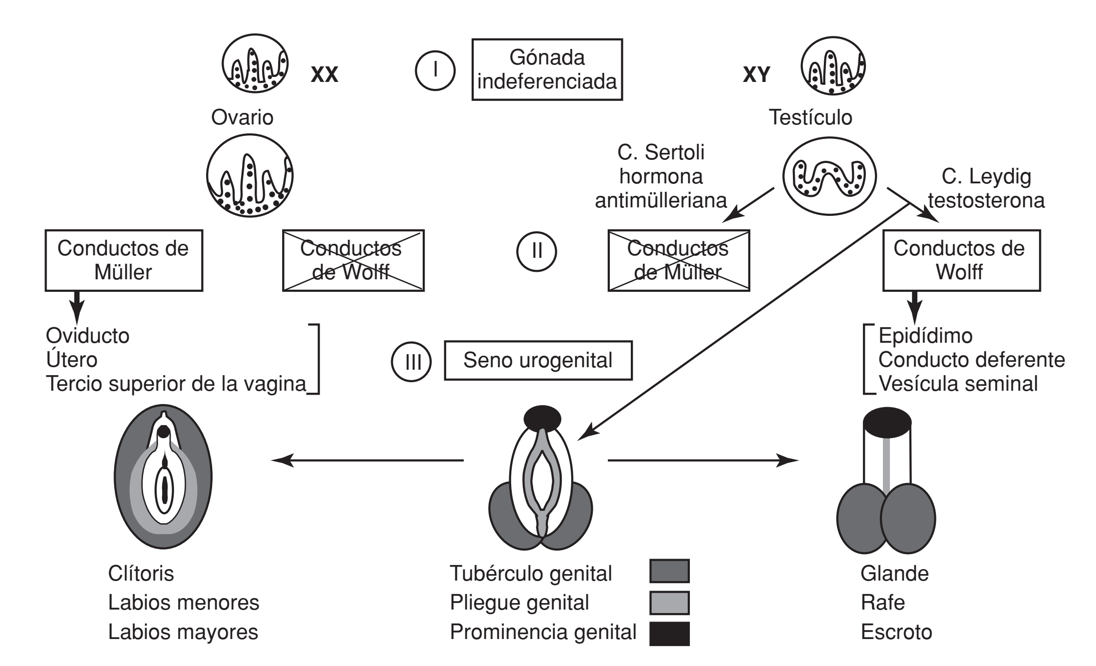


Figura 23-7. Representación esquemática de los genitales internos y externos en ambos sexos. I. gónadas; II. conductos y III. seno urogenital. En el caso de las hembras genéticas (XX), el conducto de Wolf degenera y el conducto de Müller forma los genitales internos. Los genitales externos femeninos se diferencian "espontáneamente". En el caso de los machos genéticos (XY), la gónada indiferenciada se transforma en un testículo, que produce la hormona antimülleriana, y la testosterona, necesaria para la diferenciación tanto de los genitales internos como de los genitales externos del varón.

Conclusiones

Una analogía entre los cambios morfológicos y la expresión de genes durante el desarrollo es necesaria para entender los mecanismos involucrados en la diferenciación gonadal.

Una analogía entre los cambios morfológicos y la expresión de genes durante el desarrollo es necesaria para entender los mecanismos involucrados en la diferenciación gonadal. Los mecanismos que llevan a la diferenciación de un testículo o un ovario a partir de un primordio gonadal embrionario bipotencial, están regulados por la presencia o ausencia de genes cromosómicos o autosómicos que se expresan desde etapas muy tempranas del desarrollo.

En la actualidad, muchos de los procesos de diferenciación sexual se han originado de estudios relacionados con desórdenes congénitos y anormalidades de la diferenciación sexual. La mayoría de estas anormalidades se debe a defectos en genes específicos, y el análisis detallado de estos desórdenes en humanos y animales ha permitido entender algunos mecanismos endocrinos, moleculares y genéticos que regulan la diferenciación sexual.

La identificación del gen *Sry*, como el factor determinante del testículo en los mamíferos, abrió la oportunidad para estudiar los mecanismos moleculares y celulares involucrados en el desarrollo del testículo fetal. Si este gen no está presente, como en el caso de las hembras XX, un programa genético alternativo se ejecuta para llevar la diferenciación gonadal hacia ovario.

En el ratón, el establecimiento morfológico del testículo se lleva acabo a los 12.5 *dpc,* mientras que la expresión del gen que inicia este proceso (*Sry*) se expresa 24 horas antes. Por lo tanto, la expresión temprana del *Sry* involucra la regulación de genes que controlan la diferenciación de las células de Sertoli y de Leydig, por un lado, y la formación de los cordones seminíferos por otro. Este gen podría también estar regulando la acción de hormonas, como la hormona antimülleriana y la testosterona para transformar el tracto urogenital indiferenciado hacia macho. La ausencia de estos factores embrionarios conduce el desarrollo hacia hembra, por lo que puede concluirse que la tendencia natural del embrión en términos de diferenciación sexual es hacia la feminización, mientras que el proceso de masculinización requiere de un sistema inductor complejo con múltiples mecanismos de regulación.



Referencias bibliográficas

Álvarez-Buylla, A. y Merchant, H., "Mouse primordial germ cells use fibronectine as a substrate for migration", *Exptl. Cell Res.,* **165:** 362-368, 1986.

Armstrong, J.F.; Pritchard-Jones, K.; Bickmore, W.A.; Hastie, N.D. y Bard, J.B.L., "The expression of the Wilms' tumor gene, Wt-1 in the developing mammalian embryo", *Mech. Dev.,* **40:** 85-97, 1992.

Berta, P.; Hawkins, J.R.; Sinclair, A.H.; Taylor, A.; Griffiths, B.L.; Goodfellow, P.N. y Fellows, M., "Genetic evidence equating SRY and the male sex determining gene", *Nature,* **348:** 248-250, 1990.

Brambell, F.W. y Parkes, S.A., "Changes in the ovary of the mouse following exposure to X-rays: 3. Irradiation of nonparous adult", *Prog. Roy. Soc. B.,* **101:** 36, 1927.

Burgoyne, P.S., "Role of mammalian Y chromosome in sex determination", *Philos. Trans. R. Soc. Lond.,* **B322:** 63-72, 1988.

Cate, R.L.; Donahoe, P.K. y MacLaughlin, "Müllerian inhibiting substance", *Handbook Exp. Pharmacol.,* **95:** 179-210, 1990.

Chiquione, A.D., "The identification origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo", *Anat. Rec.,* **118:** 135-146, 1954.

Dolci, S. y DeFelici, M., "A study of meiosis in chimeric mouse fetal gonads", *Development,* **109:** 37-40, 1990.

Eicher, E.M. y Washburn, L.L., "Inherited sex reversal in mice: Identification of a new primary sex-determining gene", *J. Exp. Zool.,* **228:** 297-304, 1983.

Escalante, D. y Merchant-Larios, H., "Somatic and germ cell interactions during histogenetic aggregation of mouse fetal testes", *Exp. Cell. Res.,* **198:** 150-158, 1992.

Gardner, R.L., "Germ plasm and the differentiation of the germ line", *Int. Rev. Cytol.,* **43:** 229-280, 1975.

Godin, I. y Wylie, C.C., "TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture", *Development,* **113:** 1451-1457, 1991.

Gomperts, M.; García-Castro, M.; Wylie, C. y Heasman, J., "Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos", *Development,* **120:** 135-141, 1994.

Gondos, B., "Germ cell differentiation and intercellular bridges", en *Ultrastructure of Reproduction,* Van Berkmon, J. y Motta, P.M., eds., Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 31-45, 1984.

Hacker, A.; Capel, B.; Goodfellow, P. y Lovell-Badge, R., "Expression of sry, the mouse sex determining gene", *Development*, 121, 1603-1614, 1995.

Hastie, N.D., "Dominant negative mutations in the Wilms' tumor gene Wt1 cause Denys-Drash syndrome: proof that a tumor suppressor plays a crucial role in normal genitourinary development", *Hum. Mol. Genet.,* **1:** 293-295, 1992.

Ilmense, K.; Mahowald, A.P. y Loomis, M.R., "The ontogeny of germ plasm during oogenesis in Drosophila", *Devel. Biol.,* **49:** 40-65, 1976.

Josso, W.; Picard, J.Y. y Tran, D., "The antimüllerian hormone", *Recent. Prog. Horm. Res.,* **33:** 117-163, 1977.

Koopman, P.; Gubbay, J.; Vivian, N.; Goodfellow, P. y Lovell-Badge, R., "Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry", *Nature,* **351:** 117-121, 1991.

———; Münsterberg, A.; Blanche, C.; Vivian, N. y Lovell-Badge, R., "Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation", *Nature,* **348:** 450-452, 1990.

Kreidberg, J.A.; Sariola, H.; Loring, J.M.; Maeda, M.; Pelletier, J.; Housman, D. y Jaenisch, R., "WT-1 is required for early kidney development", *Cell,* **74:** 679-691, 1993.

Kuwana, T.; Maeda, S.H. y Fujimoto, T., "Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage *in vitro*", *Anat. Rec.,* **215:** 403-408, 1986.

Lawson, K.A.; Dunn, R.N.; Roelen, B.A.; Zeinstra, L.M.; Davis, A.M.; Wright, C.V.; Korving, J.P. y Hogan, B.L. *Bmp4* is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. **Genes & Development. 13:** 424-436, 1999.

MacGregor, G.R.; Zambrowicz, P. y Soriano, P., "Tissue non-specific, alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells", *Development,* **121:** 1487-1496, 1995.

McElreavey, K.; Vilain, E.; Abbas, N.; Herskowitz, I. y Fellows, M., "A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **90:** 3368-3372, 1993.

McCoshen, J.A. y McCallion, D.J., "A study of primordial germ cells during their migratory phase in steel mutant mice", *Experientia,* **31:** 589-590, 1975.

Merchant-Larios, H., "The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary", Elsevier, Nueva York, 453-462, 1976.

———, "Origin of the somatic cells in the rat gonad: an autoradiographic approach", *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.,* **19:** 1219-1229, 1979.

———, "Germ and somatic cells interactions during gonadal morphogenesis", en, *Ultrastructure of Reproduction,* Blerkmon, J. y Motta, P.M., eds., Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 19-30, 1984.

———; Moreno-Mendoza, N. y Buehr, M., "The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis", *Int. J. Dev. Biol.,* **37:** 407-415, 1993.

———; Popova, L. y Reyss-Brion, M., "Early morphogenesis of chick gonad in the absence of mesonephros", *Develop. Growth and Differ.,* **26:** 403-417, 1984.

——— y Chimal-Monroy, J., "The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary", *Devel. Ultras. Reprod.,* 55-63, 1989.

Moreno-Mendoza, N.; Herrera-Muñoz, J. y Merchant-Larios, H., "Limb bud mesenchyme permits seminiferous cord formation in the mouse fetal testis but subsequent testosterone output is markedly affected by the sex of the donor stromal tissue", *Devel. Biol.,* **169:** 51-56, 1995.

Münsterberg, A. y Lovell-Badge, R., "Expression of the mouse antimüllerian hormone gene suggest a role in both male and female sexual differentiation", *Development,* **113:** 613-624, 1991.

Ozdzenski, W., "Observations on the origin of primordial germ cells in the mouse", *Zoologica Pol.,* **17:** 367-379, 1967.

Palmer, S.J. y Burgoyne, P.S., "The *Mus musculus domesticus tdy* allele acts later than the *Mus musculus domesticus Tdy* allele: a basis for XY sex-reversal in C57BL-6Ypos mice", *Development,* **113:** 709-714, 1991.

Paranko, J.; Pelliniemi, J.; Vaheri, A.; Foidart, J.M. y Lakkala-Paranko, T., "Morphogenesis and fibronectin in sexual differentiation of rat embryonic gonads", *Differentiation,* **S23:** S72-S81, 1983.

Russo, J. y De Rosas, J.C., "Differentiation of Leydig cell of the mouse testis during the fetal period. An ultrastructural study", *Am. J. Anat.,* **130:** 461-480, 1971.

Schöler, H.R.; Hatzopoulos, A.K.; Balling, R.; Suzuki, N. y Gruss, P., "A family of actamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor", *Eur. Mol. Biol. Organ. J.,* **9(8):** 2543-2550, 1989.

Toyooka, Y.; Tsunekawa, N.; Takahashi, Y.; Matsui, Y.; Satoh, M. y Noce, T., "Expression and intracellular localization of mouse *Vasa*-homologue protein during germ cell development", *Mechanisms of Development,* **93:** 139-149, 2000.

Upadhyay, S. y Zamboni, L., "The role of the mesonephros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways", en *Development and function of reproductive organs. V workshop on development and function of reproductive organs,* Copenhage, Byskov, A. y Peters, H., eds., *Excerpta Medica*, Amsterdan, 18-27, 1981.

———— , "Ectopic germ cells: Natural model for the study of germ cell sexual differentiation", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **79:** 6584-6588, 1982.

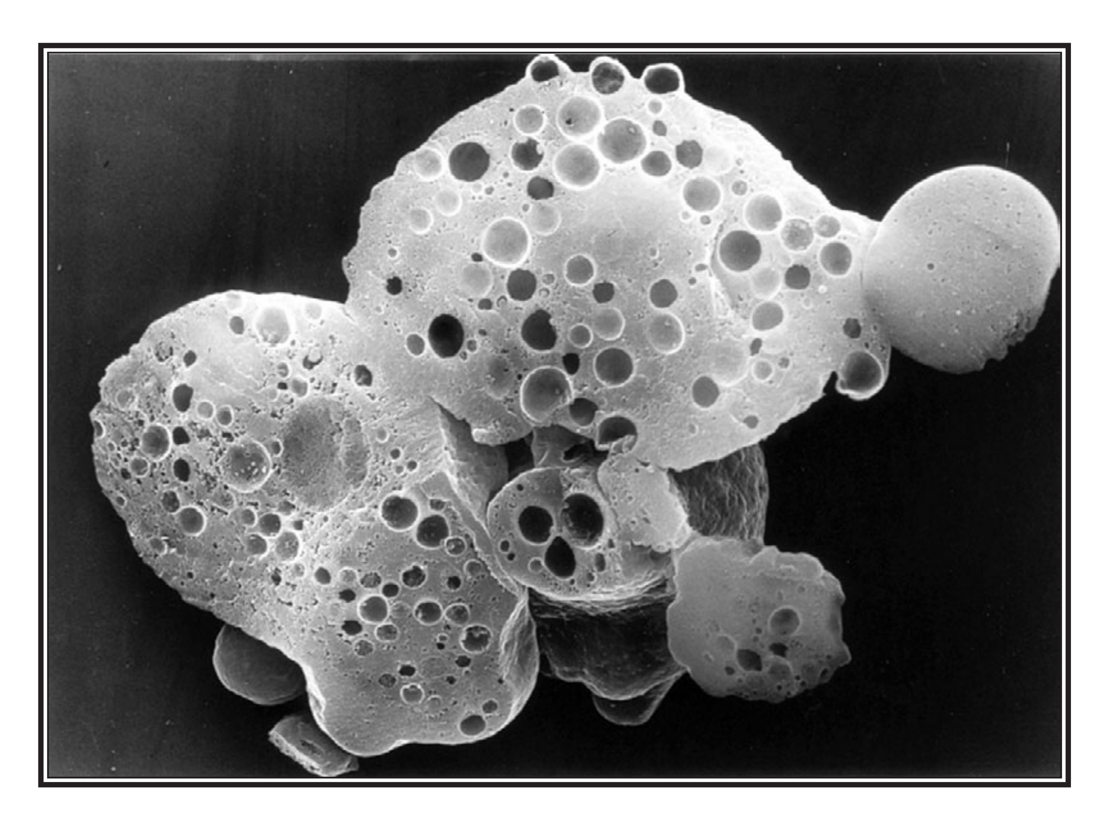
Wartenberg, H., "The influence of the mesonephric blastema on gonadal development and sexual differentiation", en *Development and function of reproductive organs. V workshop on development and function reproductive organs,* Copenhage, Byskov, A.G. y Peters, H., eds., *Excerpta Medica*, Amsterdan, 3-12, 1981.

Washburn, L.L. y Eicher, E.M., "Normal testis determination in the mouse depends on genetic interaction of a locus on chromosome 17 and the Y chromosome", *Genetics,* **123:** 173-179, 1989.

Zamboni, L.; Bézard, J. y Mauléon, P., "The role of the mesonephros in the development of the sheep fetal ovary", *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.,* **19:** 1153-1178, 1979.

PARTE VI

Biología celular y molecular de organismos modelo



Trofozoítos fracturados de *E. histolytica* en los que se observan abundantes vacuolas citoplasmáticas. Fotomicrografía electrónica de barrido.

Capítulo 24

Entamoeba histolytica: BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Adolfo Martínez Palomo ■ Martha Espinosa Cantellano



Introducción

De las seis especies de amibas que habitan el intestino del hombre, la *E. histolytica* es la única de importancia médica por ser un parásito patógeno. Esta amiba produce alteraciones intestinales, generalmente disentería amibiana, a consecuencia de la invasión en la mucosa del intestino grueso por las amibas. En algunos casos, por mecanismos aún no conocidos, la invasión amibiana progresa del intestino al hígado, en donde el parásito puede producir abscesos hepáticos, generalmente progresivos y de evolución mortal, a menos que los pacientes reciban tratamiento adecuado.

> De las seis especies de amibas que habitan el intestino del hombre, la *E. histolytica* es la única de importancia médica por ser un parásito patógeno.

La humanidad ha padecido la amibiasis desde hace milenios. Se han encontrado en la India documentos sánscritos de más de 3,000 años de antigüedad que refieren casos de diarrea mucosanguinolenta. A mediados del siglo XVII la ipecacuana fue introducida a Europa desde el Brasil, si bien el principio activo, la emetina, no fue descubierta sino hasta dos siglos después. En México, una de las "patrias de la amibiasis", la infección invasora ha sido y sigue siendo común. En el siglo XVII Mateo Alemán, introductor del Quijote en México, describió con detalle el padecimiento hepático que aquejó al virrey Martín Guerra durante las fiestas con las que se celebró su llegada a la Nueva España. El virrey murió..., "por opilación del hígado y un poco de calor demasiado". La autopsia describió lo que muy probablemente fue un absceso hepático amibiano. En el siglo XVIII el Real Tribunal del Protomedicato ofreció un premio a la mejor obra que analizara la naturaleza de las alteraciones inflamatorias del hígado..., "una horrible y tenaz enfermedad que afecta a los habitantes de la capital de la Nueva España" (Martínez-Palomo, 1987).

> La humanidad ha padecido la amibiasis desde hace milenios.

Sin embargo, los avances en el conocimiento de este antiguo padecimiento se dieron hasta el siglo XIX, ya que fue en 1875, en San Petersburgo, cuando Lesh describió los hallazgos clínicos y la autopsia de un caso fatal de disentería amibiana, identificó las amibas y reprodujo la enfermedad en perros. Osler informó en 1890 el primer caso de absceso hepático diagnosticado en los Estados Unidos de Norteamérica, y Councilman y Lafleur en 1891

realizaron un estudio detallado de la patología del padecimiento en autopsias de estibadores polacos que trabajaban en los muelles de Baltimore (Martínez-Báez, 1986).



Problemas por resolver

Ya en nuestro siglo, hemos tenido que esperar hasta los últimos 20 años para atestiguar la explosión de conocimientos sobre la biología de la *E. histolytica*. Dos preguntas fundamentales que han tratado de contestar los investigadores han sido:

1. ¿Por qué sólo una de cada cien infecciones da lugar a trastornos clínicos? ¿Existen dos especies de amibas diferentes, como propuso Brumpt en Francia en 1925 (Brumpt, 1925): una patógena responsable de las formas invasoras (*E. disenteriae*) y otra no patógena (*E. dispar*) que siempre actúa como comensal?
2. ¿Cómo explicar la extraordinaria capacidad destructiva del parásito; un frágil protozoario tan sólo tres veces mayor a un glóbulo rojo, pero capaz de destruir casi todos los tejidos del hombre, desde el intestino y el hígado, hasta el cartílago e inclusive el hueso? ¿Cómo interpretar, además, la ineficaz respuesta inmunológica frente a la invasión amibiana en la mayoría de los casos de amibiasis extraintestinal?

En las dos últimas décadas, los estudios modernos sobre la biología celular y molecular de la amibiasis empiezan, al fin, a contestar las interrogantes que habían aguardado respuesta por más de un siglo. Empero, todavía están presentes algunos de los problemas que han obstaculizado el estudio de la biología celular y molecular del parásito: la presencia de abundantes proteasas y nucleasas, la gran sensibilidad de los cultivos axénicos a cambios en los componentes del medio de cultivo y la ausencia de un medio que promueva el enquistamiento de las amibas.

Más aún, no se conocen las bases moleculares y celulares de procesos tan fundamentales como la diferenciación de trofozoítos en quistes, el mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica del huésped y los cambios celulares que ocurren durante la división, por mencionar tan sólo algunos ejemplos (Martínez-Palomo, 1993).

Por ello es obvia la necesidad de profundizar la investigación sobre la biología de este minúsculo destructor del ser humano.



E. histolytica: ¿una especie o dos especies?

En 1925, Brumpt propuso que la amibiasis invasora es producida por una especie de amiba diferente de la responsable de la infección asintomática presente en una gran proporción de la población mundial (Brumpt, 1925). Excepto por algunos estudios aislados realizados por Simic (Simic, 1931), durante casi 50 años nada se hizo para reafirmar o para descartar esta hipótesis.

A partir de 1973 nuestro grupo inició estudios que demostraron diferencias biológicas entre cepas aisladas de pacientes con amibiasis invasora y las provenientes de portadores asintomáticos. Así, pudimos descubrir diferencias notables en la susceptibilidad de unas y otras cepas de aglutinar en presencia de concentraciones bajas de la lectina concavanalina A. Las cepas patógenas aglutinan intensamente, mientras que las no patógenas son muy poco susceptibles a aglutinar (Martínez-Palomo y cols., 1973; Trissl y cols., 1977).

A principios de la década de 1980, Sargeaunt inició en Londres una larga serie de estudios en los que aplicó la técnica de la electroforesis de isoenzimas. Después de estudiar varios miles de muestras de cultivo de amibas obtenidas de pacientes con o sin síntomas de amibiasis invasora logró definir dos grandes grupos, de acuerdo a la movilidad en la electroforesis de dos enzimas: la hexoquinasa y la fosfoglucomutasa. Los cultivos de *E. histolytica* provenientes de casos de amibiasis invasora presentan invariablemente "zimodemos" (patrones de isoenzimas) característicos de amibas patógenas, mientras que la mayoría de los parásitos aislados de portadores sin síntomas muestran zimodemos diferentes, propios de las amibas no patógenas (Sargeaunt y cols., 1982). Los resultados de Sargeaunt han sido comprobados en amibas aisladas en América Latina, América del Norte, África y Asia. Más adelante, el desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente amibas con zimodemo patógeno apoyaron la existencia de dos especies amibianas (Petri y cols., 1990; Strachan y cols., 1988; Tachibana y cols., 1990, entre otros).

Si bien la diferenciación de la *E. histolytica* en dos especies, una patógena que sería la verdadera *E. histolytica* y otra no patógena (la *E. dispar* de Brumpt), parecía ser inobjetable, los experimentos realizados en tres laboratorios independientes sugirieron la posibilidad de interconversión *in vitro* de cepas patógenas a no patógenas y viceversa (Andrews y cols., 1990; Mirelman y cols., 1986; Orozco, 1992). Sin embargo, la biología molecular ha proporcionado los adelantos más importantes en la diferenciación entre amibas patógenas y no patógenas; a la fecha, todos los genes clonados de una y otra cepa muestran diferencias en su secuencia nucleotídica. Más aún, la clonación y expresión de las enzimas hexoquinasa y fosfoglucomutasa muestran diferencias en la estructura primaria de estas enzimas, que explican la distinta migración electroforética observada por Sargeaunt en los patrones isoenzimáticos (Ortner y cols., 1997). La existencia de dos especies de amibas se encuentra apoyada, además, por estudios epidemiológicos que indican que la interconversión no ocurre en portadores asintomáticos (Ruiz-Palacios y cols., 1992). Por otro lado, Diamond y Clark han demostrado que los resultados de la interconversión se explican simplemente por la contaminación de cultivos de cepas no patógenas con amibas de una cepa patógena (Clark y cols., 1992). La existencia de dos especies de amiba, la *E. histolytica* y la *E. dispar*, ha sido aceptada en 1997 por un comité de expertos convocados en México por la Organización Mundial de la Salud.

La biología molecular ha proporcionado los adelantos más importantes en la diferenciación entre amibas patógenas y no patógenas.

La existencia de dos especies de amiba, la *E. histolytica* y la *E. dispar*, ha sido aceptada en 1997.

La disponibilidad de bibliotecas genómicas y de expresión de *E. histolytica* ha permitido desarrollar sondas moleculares que contienen secuencias de DNA altamente específicas de ambos tipos de cepas (Bracha y cols., 1990; Edman y cols., 1990; Garfinkel y cols., 1989; Tachibana y cols., 1991a; Tannich y cols., 1989). Las sondas desarrolladas a principios de la década de 1990 muestran ya excelente especificidad y alta sensibilidad (Clark y Diamond, 1991; Que y Reed, 1991; Tachibana y cols., 1991b; Tannich y Burchard, 1991), pero su aplicación en la práctica clínica requiere aún simplificaciones técnicas considerables.

Ciclo de vida

El ciclo de vida de la *E. histolytica*. incluye cuatro estadios consecutivos: trofozoítos, prequistes, quistes y formas metaquísticas.

Los trofozoítos proliferan en el colon donde, en condiciones no conocidas, originan la forma de resistencia: el quiste, presente en las heces de los pacientes y portadores asintomáticos.

Cada quiste da origen a ocho amibas en la luz del intestino grueso.

El gran protozoólogo inglés Dobell estudió en la década de 1920 el ciclo de vida de la *E. histolytica*, no en humanos, sino en chimpancés, porque, según confiesa en sus artículos científicos..., ¡prefería la compañía de estos últimos! (Dobell, 1928). El ciclo incluye cuatro estadios consecutivos: trofozoítos, prequistes, quistes y formas metaquísticas. La investigación se ha centrado en las formas quísticas y en los trofozoítos, dejando atrás el conocimiento de los otros dos estadios. Los trofozoítos proliferan en el colon donde, en condiciones no conocidas, originan la forma de resistencia: el quiste, presente en las heces de los pacientes y portadores asintomáticos. Los quistes son redondeados, hialinos, de 8 a 20 μm de diámetro, con una pared rígida. Estos quistes contaminan los alimentos y el agua; al llegar a un nuevo huésped su pared se disuelve por acción de los jugos gástricos e intestinales. Después de varias divisiones celulares, cada quiste da origen a ocho amibas en la luz del intestino grueso del inadvertido huésped humano.



Los trofozoítos

Los trofozoítos de *E. histolytica* son protozoarios pleomórficos muy dinámicos, cuya forma y motilidad dependen en gran medida de la temperatura, pH, osmolaridad y potencial de oxidorreducción.

Los trofozoítos de *E. histolytica* son protozoarios pleomórficos muy dinámicos, cuya forma y motilidad dependen en gran medida de la temperatura, pH, osmolaridad y potencial de oxidorreducción. Las amibas en movimiento tienen forma elongada con uno o varios pseudópodos frontales y una cola o uroide y muestran movimientos citoplásmicos y de desplazamiento continuos; en cambio, los trofozoítos en reposo tienden a ser esféricos. El diámetro de la célula varía entre 10 y 60 μm, no sólo debido al pleomorfismo del parásito, sino también por las condiciones de nutrición: las amibas obtenidas directamente de lesiones intestinales o hepáticas son más grandes (20 a 40 μm) que aquellas encontradas en heces no disentéricas o en cultivo (10 a 30 μm). La intensa actividad endocítica del parásito puede manifestarse como numerosos estomas de pinocitosis o de fagocitosis, visibles con la microscopia electrónica de barrido. Presentan además finísimos filópodos en el uroide y otras regiones de la superficie celular, especialmente en amibas en cultivo monoxénico o en contacto con tejido epitelial (Martínez-Palomo, 1982).



El citoplasma

El citoplasma del trofozoíto puede ser descrito más por los organillos de los que carece, que por los que presenta. Así, el citoplasma de la *E. histolytica* no tiene mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso o rugoso bien definidos, ni microtúbulos citoplásmicos. Posee, en cambio, una gran cantidad de vesículas citoplásmicas de tamaño variable entre 0.5 y 9 µm de diámetro (figuras 24-1 y 24-2). Algunas de estas vesículas han sido identificadas a nivel estructural y/o bioquímico e incluyen vacuolas fagocíticas, vacuolas macro- y pinocíticas, lisosomas, cuerpos residuales y vacuolas autofágicas. En las vacuolas alimentarias de cultivos xénicos y monoxénicos es posible observar almidón o bacterias. Las amibas aisladas de pacientes disentéricos contienen glóbulos rojos en las vacuolas, que tradicionalmente han sido consideradas como la mejor evidencia de la naturaleza invasora del parásito. Los lisosomas amibianos difieren de aquellos de otras células eucariontes en que las enzimas se encuentran unidas a la

El citoplasma de la *E. histolytica* no tiene mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso o rugoso bien definidos, ni microtúbulos citoplásmicos. Posee, en cambio, una gran cantidad de vesículas citoplásmicas de tamaño variable.

Los lisosomas amibianos difieren de aquellos de otras células eucariontes en que las enzimas se encuentran unidas a la membrana y no libres en el compartimento vacuolar.

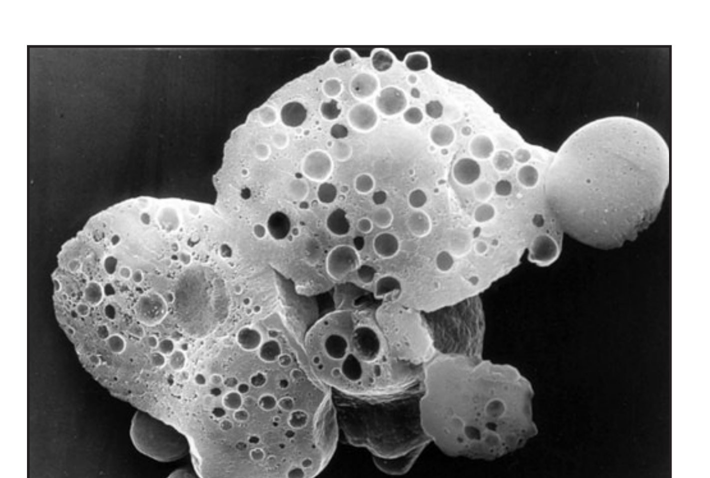


Figura 24-1. Trofozoítos fracturados de *E. histolytica* en los que se observan abundantes vacuolas citoplasmáticas. Fotomicrografía electrónica de barrido.

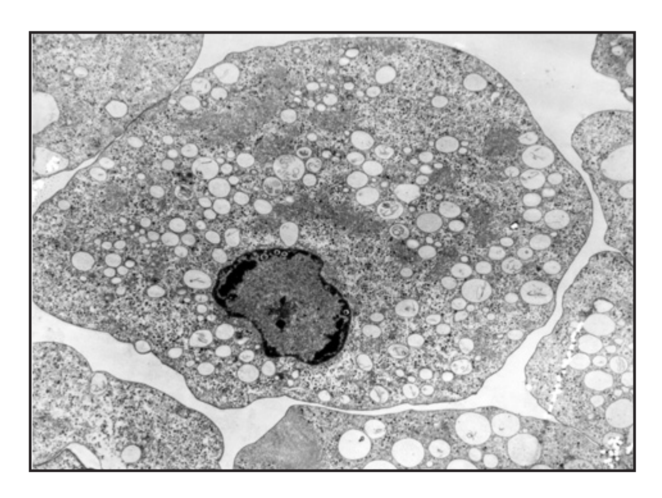


Figura 24-2. Componentes citoplásmicos y nucleares del trofozoíto de *E. histolytica*. Fotomicrografía electrónica de transmisión.

membrana y no libres en el compartimento vacuolar. Sin embargo, la naturaleza y función de otras vesículas presentes en el citoplasma aún no se conocen (Martínez-Palomo, 1986b).

Una serie de túbulos y vesículas que superficialmente semejan al retículo endoplásmico liso puede observarse ocasionalmente en el citoplasma de *E. histolytica*. Los túbulos, de aproximadamente 20 nm de diámetro, forman espirales irregulares o arreglos paralelos. En contraste con los 10 nm de grosor de las membranas plasmática y vesicular, la membrana que cubre estos túbulos mide únicamente 6 nm (Martínez-Palomo, 1982).

Los ribosomas se encuentran ordenados en cúmulos helicoidales. En los quistes y en los trofozoítos en reposo en cultivo, estos grupos helicoidales se agregan formando grandes inclusiones cristalinas que pueden llegar a medir varios micrómetros de largo; son éstos los clásicos cuerpos cromidiales que presentan un patrón hexagonal. No se sabe, sin embargo, si los ribosomas en los cúmulos helicoidales o en los cuerpos cromidiales están funcionalmente maduros o corresponden a precursores de ribosomas.

A pesar de la gran motilidad y plasticidad del trofozoíto, poco se conoce acerca de la organización estructural del citoesqueleto. Hasta muy recientemente, a través de microscopia electrónica de transmisión sólo se habían observado escasos filamentos semejantes a la actina polimerizada, concentrados en las zonas de adhesión cercanas a la membrana plasmática y dispersos en el citoplasma. Sin embargo, el desarrollo de las técnicas de criofijación y criosustitución, que permiten una mejor preservación del material biológico y reducen los artificios inducidos por la fijación química, han revelado la ultraestructura del parásito con un detalle no alcanzado con las técnicas convencionales.

Filamentos similares a la actina en diámetro y forma se observan no sólo concentrados en la membrana plasmática, sino también en los pseudópodos y estomas fagocíticos. Más aún, filamentos de miosina, que sólo habían sido observados por inmunofluorescencia (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 1994), han sido visualizados ahora por microscopia electrónica de transmisión. Estos estudios han confirmado la ausencia de microtúbulos en el citoplasma y núcleo de las amibas en interfase. Estos últimos sólo han sido observados en los núcleos de los trofozoítos en división (González-Robles y Martínez-Palomo, 1992).

El resto de los componentes citoplásmicos visibles al microscopio electrónico es de naturaleza desconocida. Se encuentran con frecuencia estructuras morfológicamente semejantes a los rabdovirus, dispuestos en forma de roseta. Sin embargo, la naturaleza viral de estas estructuras no ha sido comprobada (Martínez-Palomo, 1982).

> La membrana plasmática del parásito tiene una cubierta celular gruesa.

> La cubierta de superficie de las amibas contiene receptores para moléculas presentes en células blanco y componentes de la matriz extracelular de los tejidos que invaden.

La membrana plasmática del parásito tiene una cubierta celular gruesa, muy evidente cuando se emplean métodos de criofijación y criosustitución. Los componentes químicos de esta cubierta son de gran interés, ya que en ella se localiza buena parte de los antígenos relevantes para la respuesta inmune humoral. La cubierta de superficie de las amibas contiene, además, receptores para moléculas presentes en células blanco y componentes de la matriz extracelular de los tejidos que invaden, así como otros

elementos que posiblemente confieren al parásito parte de su capacidad destructora.

Una de las propiedades más llamativas de la *E. histolytica* es la gran plasticidad de los componentes de la superficie celular. Cuando las amibas se ponen en contacto con ligandos, como ciertas lectinas o anticuerpos antiamiba, los complejos ligando receptor —inicialmente distribuidos uniformemente en la superficie celular— experimentan rápidamente una redistribución hacia el polo posterior o uroide de la amiba. La redistribución se realiza por un mecanismo de deslizamiento de actina y miosina mediado por calmodulina y una cinasa de cadena ligera de la miosina (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 1994). A continuación, este casquete (*cap*) es liberado al medio extracelular o, en algunos casos, es incorporado al citoplasma amibiano a través de vacuolas citoplásmicas donde es degradado por las enzimas hidrolíticas (Calderón y Ávila, 1986; Espinosa-Cantellano y cols., 1992; Pinto da Silva y cols., 1975; Trissl y cols., 1977).



El núcleo

Gran parte de los caracteres morfológicos consignados en los textos de parasitología sobre el núcleo de la *E. histolytica* son artificios de fijación. En amibas vivas vistas al microscopio óptico, el núcleo, de 4 a 7 μm de diámetro, es poco aparente. Puede ser visualizado con el auxilio de la microscopia de contraste de fases o de interferencia de Nomarski. Por microscopia electrónica de transmisión, la membrana nuclear se observa como una doble membrana interrumpida por abundantes poros nucleares de aproximadamente 65 nm de diámetro. Al interior de la membrana nuclear se localizan gruesos cúmulos de cromatina condensada y en su centro destaca un endosoma rico en DNA (figura 24-2). Los colorantes fluorescentes que se unen específicamente al DNA muestran en el núcleo de los trofozoítos en metafase seis condensaciones de cromatina, que han sido interpretadas como cromosomas (Argüello y cols., 1992). La división nuclear ocurre por mitosis cerrada, ya que la membrana nuclear no se fragmenta. Con métodos de fijación especiales, la microscopia electrónica revela haces de microtúbulos intranucleares durante la división, originados a partir de un centro organizador de microtúbulos.

> Al interior de la membrana nuclear se localizan gruesos cúmulos de cromatina condensada y en su centro destaca un endosoma rico en DNA.



Los quistes

Muy poco se ha avanzado en el conocimiento de la bioquímica y la biología molecular de los quistes de la *E. histolytica* debido a la imposibilidad de inducir enquistamiento de trofozoítos en cultivo axénico (libre de bacterias). El proceso de diferenciación se ha estudiado solamente en la *E. invadens*, amiba de reptiles, cuyo enquistamiento puede producirse por simple dilución del medio de cultivo. La pared del quiste, vista al microscopio electrónico de transmisión, está constituida por fibrillas que se disponen en varias capas concéntricas (figura 24-3). Por determinaciones químicas y

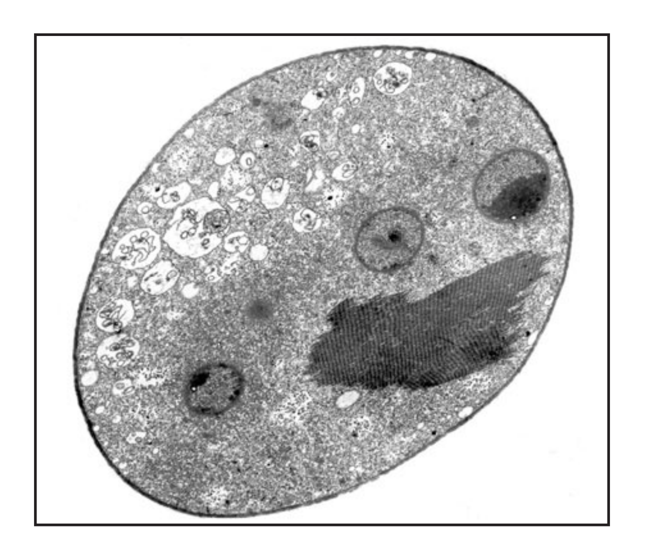


Figura 24-3. Corte de un quiste de *E. histolytica* que muestra tres núcleos, un prominente cuerpo cromidial y la gruesa pared quística. Fotomicrografía electrónica de transmisión.

estudios de difracción de rayos X, se ha comprobado la presencia de quitina en la pared. En los hidrolizados ácidos de la pared, los principales azúcares son hexosaminas.

La membrana plasmática presenta invaginaciones profundas; en tinciones con hematoxilina, el citoplasma aparece vacuolado con numerosos depósitos de glucógeno que disminuyen en número y tamaño conforme el quiste madura. Los cuerpos cromidiales, que corresponden a agregados ribosomales, se identifican claramente en el citoplasma. La tinción con yodo permite la identificación de uno a cuatro núcleos pequeños.

Los inhibidores de la síntesis de quitina podrían, tal vez, llegar a ser empleados como alternativas para el control de la amibiasis, ya que los trofozoítos no sobreviven en las condiciones adversas del medio exterior. Sin quistes, no habría transmisión de la amibiasis en el humano.

El metabolismo de la *E. histolytica* es aeróbico facultativo con enzimas glicolíticas presentes en otros eucariontes que carecen de mitocondrias como la *Naegleria* y en ciertas bacterias.

Los carbohidratos constituyen la mayor fuente de energía del parásito.

Un aspecto singular en la glicólisis de la *Entamoeba* es la utilización de pirofosfato inorgánico (PPi), generalmente considerado un producto final del metabolismo, como fuente de energía en varias reacciones glicolíticas.

Metabolismo

El metabolismo de la *E. histolytica* es peculiar: es un aeróbico facultativo con enzimas glicolíticas presentes en otros eucariontes que carecen de mitocondrias como la *Naegleria* y en ciertas bacterias. Este metabolismo puede actuar en favor del parásito, al permitirle cambiar de un sitio de baja tensión de oxígeno como es la luz intestinal a uno de alta tensión de oxígeno, como son los órganos sólidos que invade el parásito —hígado, cerebro— en el transcurso de la amibiasis invasora.

Los carbohidratos constituyen la mayor fuente de energía del parásito. Los azúcares se incorporan a las amibas con un sistema de transporte específico, cien veces más eficiente que el ingreso de glucosa por endocitosis. En el parásito, la glucosa es degradada a piruvato por la vía de Embden-Meyerhof. Un aspecto singular en la glicólisis de la *Entamoeba* es la utilización de pirofosfato inorgánico (PPi), generalmente considerado un producto final del metabolismo, como fuente de energía en varias reacciones glicolíticas

(Mertens, 1993). Los genes que codifican dos de estas enzimas, la tercera y la última de la glicólisis, han sido clonados recientemente: la fosfofructocinasa dependiente de PPi (PPi-PFK) (Huang y cols., 1995) y la fosfopiruvato-dicinasa (PPDK) (Bruchhaus y Tannich, 1993; Saavedra-Lira y Pérez-Montfort, 1994). Más aún, la estructura primaria de la enolasa, que cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenol-piruvato, también ha sido comunicada (Beanan y Bailey, 1995).

Los productos finales de degradación del piruvato dependen del grado de anaerobiosis: en condiciones aeróbicas (hasta 5% de oxígeno) se forma acetato, etanol y CO_2, mientras que en un ambiente anaeróbico sólo se produce etanol y CO_2. Las actividades enzimáticas relacionadas con este proceso incluyen a la piruvato-sintetasa, aldehído-deshidrogenasa (ALDH) y alcohol-deshidrogenasa (ADH) dependiente de NAD^+ y $NADP^+$. Recientemente se ha notificado la presencia en el parásito de una acetaldehído/alcohol-deshidrogenasa multifuncional dependiente de NAD^+, enzima que sólo había sido identificada en bacterias anaerobias o anaerobias facultativas (Bruchhaus y Tannich, 1994; Yang y cols., 1994). Se ha sugerido que durante la aerobiosis los electrones son transferidos de sustratos reducidos, a través de una serie de acarreadores que incluyen flavinas, ferredoxinas, otras proteínas FeS y ubiquinona, al oxígeno molecular, que es reducido a H_2O (Ellis y cols., 1994; Weinbach, 1981). En condiciones anaeróbicas, la reacción parece estar catalizada por la enzima piruvato: ferredoxina-oxidorreductasa (Rodríguez y cols., 1996).

La *E. histolytica* se considera singular entre los eucariontes por carecer de glutatión o enzimas dependientes de glutatión (Fahey y cols., 1984). En otros organismos, la función primordial del glutatión es la protección contra la toxicidad del oxígeno. En *Entamoeba* se han identificado altas concentraciones de cisteína y otros tioles, que podrían sustituir esta función del glutatión (Fairlamb, 1989). Adicionalmente, la presencia de una disulfido-oxidorreductasa que utiliza FAD como cofactor y reduce el alquil-hidroperóxido y H_2O_2 a través de NADH o NADPH, se ha sugerido como otro mecanismo de protección contra el daño de agentes oxidantes (Bruchhaus y Tannich, 1995).

> La *E. histolytica* se considera singular entre los eucariontes por carecer de glutatión o enzimas dependientes de glutatión.

Los avances en la caracterización bioquímica de las membranas celulares y particularmente de la membrana plasmática de la *E. histolytica* se han visto retrasados por la ausencia de marcadores de la membrana plasmática que faciliten la evaluación del grado de purificación de las fracciones de la misma y por la adsorción de diferentes componentes del suero a la cubierta celular del parásito y por la dificultad para obtener grandes cantidades de parásitos, necesarias para los estudios bioquímicos.

El análisis de los lípidos membranales de la *E. histolytica* ha mostrado el predominio de la etanolamina sobre la colina. Se ha encontrado un fosfolípido poco común, la ceramida aminoetil-fosfonato y abundante fosfatidilcolina (Aley y cols., 1980). Esta composición poco usual de los lípidos membranales podría explicar, al menos parcialmente, la gran plasticidad y la estabilidad de las membranas de los trofozoítos (Cerbón y Flores, 1981). Con la concanavalina A como agente estabilizador para obtener fracciones purificadas de membrana plasmática, Aley y cols. detec-

> El análisis de los lípidos membranales de la *E. histolytica* ha mostrado el predominio de la etanolamina sobre la colina.

taron 12 glicoproteínas principales con pesos moleculares entre 12,000 y 200,000 kDa.

Antígenos

Los estudios iniciales de los componentes antigénicos de la *E. histolytica* mostraron grandes discrepancias debido a que no se controló la intensa actividad proteolítica de las enzimas del trofozoíto liberadas durante la preparación de las muestras. Los experimentos más recientes con sueros de pacientes con absceso hepático amibiano han revelado que, a pesar de su complejidad, las cepas de *E. histolytica* de diferentes áreas geográficas son muy similares antigénicamente (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 1991; Joyce y Ravdin, 1988).

> Algunas moléculas de superficie que participan en la adhesión a células blanco o a la mucosa intestinal son reconocidas por el suero de pacientes con amibiasis invasora.

Algunas moléculas de superficie que participan en la adhesión a células blanco o a la mucosa intestinal son reconocidas por el suero de pacientes con amibiasis invasora. Entre éstas se encuentran una adhesina de 260 kDa, inhibida por la *N*-acetil-*D*-galactosamina, formada por dos subunidades de 170 y 35 kDa (Petri y cols., 1989), una lectina de 220 kDa inhibida por *N*-acetilglucosamina (Rosales-Encina y cols., 1987) y una adhesina de 112 kDa (Arroyo y Orozco, 1987). Los anticuerpos producidos contra estas proteínas purificadas inhiben parcialmente la adhesión y fagocitosis de células blanco *in vitro*, sugiriendo su participación en la adherencia amibiana. Otros antígenos de superficie reconocidos por sueros de pacientes incluyen péptidos de 30, 90, 96 y 125 kDa, una proteína abundante en serina y un lipopeptidofosfoglicano (revisado en Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 1991).



Enzimas

Se han identificado algunas enzimas en la membrana plasmática de *E. histolytica*, como la Ca^{+2}-ATPasa, la fosfolipasa A, la neuraminidasa y una metalocolagenasa que se piensa participa en la invasión del parásito (revisado en Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 1991). Las cisteína-proteasas son las proteasas más abundantes y han sido relacionadas con la patogenicidad de los trofozoítos de *E. histolytica*, ya que se ha demostrado que la expresión de genes de algunas cisteína-proteasas es 10 a 100 veces mayor en amibas patógenas que en no patógenas. Se ha informado de cuatro principales cisteína-proteasas: la proteasa de 56 kDa (Keene y cols., 1986), la histolisina de 26 a 19 kDa (Luaces y Barret, 1988), la amibapaína de 22 a 27 kDa (Scholze y cols., 1992) y la catepsina B de 16 kDa (Lushbaugh y cols., 1985).

> Se ha calculado que el contenido del DNA de las amibas es de 0.5 pg por núcleo, con un tamaño genómico de 4.0×10^8 pares de bases.



Biología molecular

Se ha calculado que el contenido del DNA de las amibas es de 0.5 pg por núcleo, con un tamaño genómico de 4.0×10^8 pares de bases (Byers, 1986).

Todo el DNA se encuentra dentro del núcleo, ya que no existen mitocondrias u otros organelos que contengan DNA. Sin embargo, se encuentran presentes varias copias de rRNA como elementos circulares extracromosómicos. El número de copias varía dependiendo de la cepa (Huber y cols., 1989). El equivalente del nucleolo no es, como se pensaba, el endosoma; las regiones ricas en RNA se encuentran distribuidas hacia la periferia del núcleo. La cromatina de la *E. histolytica* se encuentra organizada en partículas de 10 nm de diámetro, similares a los nucleosomas. Sin embargo, la digestión con nucleasa microcóccica no revela un producto típico "en escalera" en los geles de agarosa (Torres Guerrero y cols., 1991). Estudios posteriores han demostrado que la unidad estructural se encuentra formada por histonas atípicas (Scharfetter y cols., 1997).

Todo el DNA se encuentra dentro del núcleo, ya que no existen mitocondrias u otros organelos que contengan DNA.

El equivalente del nucleolo no es, como se pensaba, el endosoma; las regiones ricas en RNA se encuentran distribuidas hacia la periferia del núcleo.

No existe aún acuerdo sobre la equivalencia citológica de los "cromosomas" con los cariotipos moleculares de las amibas. El marcaje del DNA con compuestos fluorescentes muestra seis áreas de condensación nuclear que pudieran corresponder a la organización de cromatina en cromosomas (Argüello y cols., 1992). Sin embargo, el análisis molecular muestra un cariotipo complejo con 11 a 20 bandas, que presenta diferencias en el número y tamaño de las mismas al compararlas, no sólo entre diferentes cepas y especies, sino también en distintas preparaciones de DNA de la misma especie. Se ha sugerido que estas variaciones pudieran ser el resultado de rearreglos masivos de DNA en el parásito (Orozco y cols., 1993; Petter y cols., 1993).

Al contrario de lo que sucede en la mayoría de los eucariontes unicelulares, en donde el rDNA se encuentra dentro de los cromosomas, en la amiba el rDNA parece existir exclusivamente en moléculas circulares extracromosomales (Bhattacharya y cols., 1989; Huber y cols., 1989). Esta característica peculiar es compartida con amibas del género *Naegleria*.

Por ensayos tipo Southern, recientemente se han detectado varias moléculas de DNA circular que no corresponden a rDNA (Dhar y cols., 1995). La presencia de estas moléculas en el núcleo se encuentra apoyada por la hibridación de varias clonas de cDNA con regiones codificantes para proteínas en el DNA resistente a la acción de exonucleasas (Lioutas y cols., 1995). El origen y función de estos elementos de DNA circular requiere ser investigado, pero su presencia podría explicar, al menos parcialmente, las grandes variaciones en número y tamaño del cariotipo del parásito.

El estudio de mutantes de *E. histolytica* resistentes a varios medicamentos, entre ellas la emetina y la colchicina, ha permitido identificar una familia de genes similar a los genes *mdr*, que pudiera participar en la resistencia a medicamentos. Tal vez la amibas poseen un mecanismo de multirresistencia similar al descrito en células tumorales (Descoteaux y cols., 1992; Samuelson y cols., 1990), si bien en la práctica clínica la resistencia a medicamentos antiamibianos no es un problema importante.

El primer gen clonado en la *E. histolytica* fue el de la actina (Edman y cols., 1987; Huber y cols., 1987). Desde entonces, una gran cantidad de genes del parásito han sido identificados, sus secuencias analizadas y sus

El primer gen clonado en la *E. histolytica* fue el de la actina.

productos caracterizados. A pesar de estos avances, quedan aún por resolver muchas interrogantes. La mutagénesis química del DNA de amibas patógenas se ha utilizado para explorar la relación de los productos genómicos con funciones específicas (De la Garza y cols., 1989; Rodríguez y Orozco, 1986); el análisis de las secuencias moleculares han iniciado el avance en el conocimiento de la regulación de la transcripción y traducción genómica; y la transfección de genes (Alon y cols., 1997; Hamann y Tannich, 1997; Nickel y Tannich, 1994; Olvera y cols., 1997; Purdy y cols., 1994; Ramakrishnan y cols., 1997) está siendo aplicada para estudiar la función biológica de algunas proteínas importantes para la sobrevida del parásito y los mecanismos de patogenicidad.

Patología molecular

Las tres condiciones requeridas para que un microorganismo produzca enfermedad (que sea transmisible, invasor y patógeno) se cumplen por las cepas virulentas de *E. histolytica.*

Las tres condiciones requeridas para que un microorganismo produzca enfermedad (que sea transmisible, invasor y patógeno) se cumplen con creces por las cepas virulentas de *E. histolytica* (figura 24-4). Las bases celulares del efecto citopático de las amibas sobre células eucariontes ha sido analizada con la microcinematografía espaciada y la microscopia electrónica de transmisión y de barrido. Los mecanismos de agresión de la *E. histolytica* son complejos, pues representan la suma de acciones mecánicas, tóxicas, enzimáticas y fagocíticas. Éstas incluyen:

1. La adhesión de la amiba a la célula blanco mediante "adhesinas".
2. El daño a la membrana plasmática de la célula blanco con la táctica de "golpear y huir" (*hit and run*) y la liberación de enzimas proteolíticas y de un péptido peculiar, el "amiboporo", semejante químicamente a la melitina, principal componente del veneno... ¡de las abejas!
3. La fagocitosis por succión de células vivas o de células lisadas previamente por la acción química de las amibas.

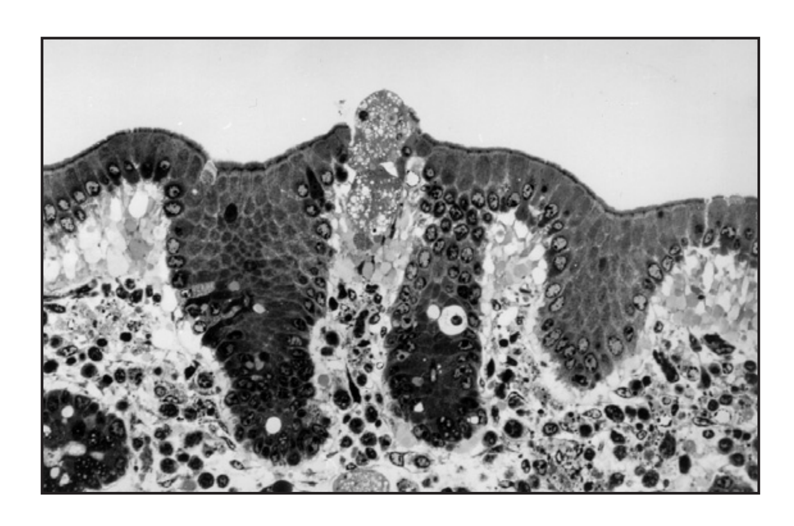


Figura 24-4. Aspecto microscópico de la invasión inicial de trofozoítos de *E. histolytica* en la mucosa intestinal de cobayo. Las amibas inician la invasión a través de los espacios interglandulares. Fotomicrografía óptica de un corte teñido con azul de toluidina.

4. La degradación intracelular de los componentes orgánicos ingeridos, por medio de la batería de potentes enzimas hidrolíticas localizadas en las vesículas citoplásmicas de los trofozoítos (Martínez-Palomo, 1986a).

Pocos minutos después de que los trofozoítos entran en contacto con células epiteliales, se inician cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática, tanto de las células como de las amibas. Es posible que las alteraciones en las células blanco se deban, al menos en parte, a la liberación del amiboporo, polipéptido de 4 a 5 kDa que produce despolarización de células *in vitro* y cambios drásticos en la conductancia de membranas artificiales (Leippe y cols., 1994). La estructura primaria parcial del péptido, determinada por secuenciación de proteínas, muestra un grado notable de semejanza con la melitina, el péptido membranolítico del veneno de las abejas, en particular de la *Apis florea*. La disposición de los aminoácidos hidrofílicos y los hidrofóbicos sugiere que ambos péptidos, el amibiano y el de las abejas, tienen también una estructura secundaria semejante.

> Pocos minutos después de que los trofozoítos entran en contacto con células epiteliales, se inician cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática, tanto de las células como de las amibas.

La lisis de las células requiere de la función de los microfilamentos de actina, ya que la citocalasina B inhibe el proceso de destrucción. Se ha invocado también la acción de una fosfolipasa (Vargas-Villarreal y cols., 1995), de una colagenasa (Muñoz y cols., 1982), así como una variedad de proteasas (Ostoa-Saloma y cols., 1989; Scholze y cols., 1992). Las principales enzimas proteolíticas liberadas por las amibas son proteasa-cisteínas. Una proteasa-tiol de 56 kDa se encuentra selectivamente en cepas patógenas de *E. histolytica* (Reed y cols., 1989).

> Las principales enzimas proteolíticas liberadas por las amibas son proteasa-cisteínas.

En la adhesión entre los parásitos con células y componentes de la matriz extracelular participan probablemente receptores amibianos a proteínas tales como la colágena, la fibronectina y la laminina. Se ha identificado un receptor común para la fibronectina y la laminina en trofozoítos de *E. histolytica* (Talamás-Rohana y Meza, 1988; Talamás-Rohana y cols., 1992; Vázquez-Prado y Meza, 1992); la unión del parásito es seguida por la degradación de estas moléculas y por una respuesta citoplásmica en los trofozoítos en forma de placas de adhesión que contienen actina. Los receptores amibianos a componentes de la matriz extracelular pudieran ser necesarios para la adherencia y la migración del parásito en los tejidos sólidos.

> Se ha identificado un receptor común para la fibronectina y la laminina en trofozoítos de *E. histolytica.*

Experimentos con líneas celulares enriquecidas genéticamente en ciertos carbohidratos de superficie han demostrado que las amibas se adhieren preferentemente a unidades de *N*-acetil-lactosamina. Las variantes celulares deficientes en estas moléculas son menos susceptibles a la lisis mediada por trofozoítos que la cepa silvestre, lo que puede significar que los carbohidratos de superficie en la célula blanco intervienen en la susceptibilidad a la virulencia (Li y cols., 1989).

La extraordinaria capacidad fagocítica de las amibas patógenas está sin duda relacionada con su virulencia. Se ha demostrado que al seleccionar cultivos amibianos deficientes en fagocitosis el resultado es un pérdida concomitante de la virulencia (Orozco y cols., 1983).

> La extraordinaria capacidad fagocítica de las amibas patógenas está sin duda relacionada con su virulencia.

En resumen, la capacidad agresora de las amibas no puede ser adjudicada a una sola proteína, toxina, enzima, organillo o función celular; es el

resultado de una combinación de factores: la liberación de toxinas y de enzimas, la motilidad activa del parásito, su capacidad de adhesión, su insaciable actividad fagocítica, su pasmosa maquinaria enzimática que degrada rápida y eficientemente los componentes orgánicos ingeridos por el parásito y su capacidad de contender exitosamente con los componentes humorales y celulares de la respuesta inmunológica del huésped.

Diagnóstico molecular

Las técnicas más importantes para el diagnóstico de la amibiasis invasora del colon son la rectosigmoidoscopia y la detección microscópica de trofozoítos hematófagos en el contenido rectal.

Las técnicas más importantes para el diagnóstico de la amibiasis invasora del colon son la rectosigmoidoscopia y la detección microscópica de trofozoítos hematófagos en el contenido rectal. La gran limitante en el diagnóstico de la amibiasis intestinal sigue siendo la identificación microscópica de los quistes y de los trofozoítos de *E. histolytica* en heces o raspados de mucosa afectada. El procedimiento es tedioso, lento y requiere de personal bien entrenado; la sensibilidad es relativamente baja, se necesitan varias muestras para identificar portadores asintomáticos o muestras frescas para la detección de trofozoítos y las técnicas para la fijación de trofozoítos son difíciles de realizar.

El absceso hepático amibiano debe ser sospechado en pacientes con fiebre, pérdida de peso y dolor abdominal en el cuadrante superior derecho. Estos sujetos presentan leucocitosis, niveles elevados de fosfatasa alcalina y elevación del diafragma derecho, evidente por radiografía de tórax. La sonografía y la tomografía computarizada revelan lesión ocupante. La resonancia magnética del hígado no proporciona mayor información que estas últimas.

Las pruebas serológicas para la búsqueda de anticuerpos antiamibianos son útiles únicamente para el diagnóstico del absceso hepático amibiano, de la amibiasis intestinal invasora y como herramienta para estudios epidemiológicos. Otras pruebas de laboratorio tienen poca utilidad diagnóstica. La prueba de la inmunofluorescencia es la más fácil de realizar; cuando se combina con la de la hemaglutinación indirecta se detectan casi todos los casos de absceso hepático producido por *E. histolytica*. La prueba de la hemaglutinación indirecta es tal vez la de elección para el diagnóstico de la amibiasis invasora; se considera positiva cuando los títulos son mayores a 1:256. Esta última prueba también ha sido utilizada en estudios epidemiológicos: los casi 68,000 sueros obtenidos durante la última encuesta seroepidemiológica nacional en México (1987-1988) mostraron una seroprevalencia de la amibiasis de 8.41% (Caballero-Salcedo y cols., 1994).

Recientemente se han concentrado esfuerzos en varios laboratorios de investigación en el desarrollo de pruebas diagnósticas con herramientas más modernas, como los anticuerpos mono- y policlonales y las sondas moleculares. Se han logrado detectar antígenos de *E. histolytica* en heces utilizando anticuerpos poli- y monoclonales (Grundy y cols., 1987; Haque y cols., 1997) o antígenos recombinantes (Myung y cols., 1992) en pruebas de ELISA; se han diferenciado cepas patógenas por inmunofluorescencia (González-Ruiz y cols., 1992) o con sondas moleculares (Cruz-Reyes y Ackers,

1992) y se ha amplificado el DNA del parásito en muestras clínicas con la reacción de polimerasa en cadena utilizando sondas no radiactivas (Aguirre y cols., 1997; Britten y cols., 1997; Romero y cols., 1992). Sin embargo, aún es necesario refinar las técnicas para ponerlas al alcance del laboratorio de análisis clínico.

¿Qué falta por hacer? Casi todo: esclarecer la naturaleza de las infecciones amibianas; lograr mejores métodos de control; desarrollar medicamentos antiamibianos más efectivos y con menos efectos secundarios; diseñar nuevas técnicas diagnósticas para uso clínico y epidemiológico y formular una vacuna antiamibiana. La biología molecular y celular tienen en la amibiasis un terreno fértil para aplicar su enorme potencial, en beneficio de los muchos pacientes, casi todos ellos pobres, que sufren o mueren a consecuencia de la invasión por este minúsculo, pero formidable enemigo: la *E. histolytica*.



Referencias bibliográficas

Aguirre, A.; Molina, S.; Blotkamp, C.; Verveij, C.; Vinuesa, T.; Valls, M.E.; Guhl, F.; Polderman, A.; Jimenez de Anta, M.T.; Corachan, M.; Gonzalez-Ruiz, A.; Frame, I.A. y Warhurst, D., "Diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in clinical specimens by PCR-SHELA", *Arch. Med. Res.,* **28(Supl.):** S282-S284, 1997.

Aley, S.B.; Scott, W.A. y Cohn, Z.A., "Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*", *J. Exp. Med.,* **152:** 391-404, 1980.

Alon, R.N.; Bracha R. y Mirelman, D., "Transfection of *Entamoeba dispar*: inhibition of expression of the lysine-rich 30 kDa surface antigen by the transcription of its antisense RNA", *Arch. Med. Res.,* **28(Supl.):** S52-S55, 1997.

Andrews, B.J.; Mentzoni, L. y Bjorvatn, B., "Zymodeme conversion of isolates of *Entamoeba histolytica*", *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,* **84:** 63-65, 1990.

Argüello, C.; Valenzuela, B. y Rangel, E., "Structural organization of chromatin during the cell cycle of *Entamoeba histolytica* trophozoites", *Arch. Med. Res.,* **23:** 77-80, 1992.

Arroyo, R. y Orozco, E., "Localization and identification of *Entamoeba histolytica* adhesin", *Mol. Biochem. Parasitol,* **23:** 151-158, 1987.

Beanan, M.J. y Bailey, G.B., "The primary structure of an *Entamoeba histolytica* enolase", *Mol. Biochem. Parasitol,* **69:** 119-121, 1995.

Bhattacharya, S.; Bhattacharya, A.; Diamond, L.S. y Soldo, A.T., "Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA", *J. Protozool.,* **36:** 455-458, 1989.

Bracha, R.; Diamond, L.S.; Ackers, J.P.; Burchard, G.D. y Mirelman, D., "Differentiation of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* by using specific DNA probes", *J. Clin. Microbiol.,* **28:** 680-684, 1990.

Britten, D.; Wilson, S.M.; McNerney, R.; Moody, A.H.; Chiodini, P.L. y Ackers, J.P., "Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* using an improved colorimetric polymerase chain reaction method", *Arch. Med. Res.,* **28(Supl.):** S279-S281, 1997.

Bruchhaus, I. y Tannich, E., "Primary structure of the pyruvate phosphate dikinase in *Entamoeba histolytica*", *Mol. Biochem. Parasitol,* **62:** 153-156, 1993.

———, "Purification and molecular characterization of the NAD+-dependent acetaldehyde/alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica", Biochem. J.,* **303:** 743-748, 1994.

———, "Identification of an *Entamoeba histolytica* gene encoding a protein homologous to prokaryotic disulphide oxidoreductases", *Mol. Biochem. Parasitol,* 187-191, 1995.

Brumpt, E., "Étude sommaire de l' '*Entamoeba dispar'* n. sp. Amibe à kystes quadrinucléés, parasite de l'homme*", Bull. Acad. Med.,* París, **94:** 943-952, 1925.

Byers, T.J., "Molecular biology of DNA in *Acanthamoeba, Amoeba, Entamoeba* and *Naegleria*", *Int. J. Cytol.,* **99:** 311-341, 1986.

Caballero-Salcedo, A.; Viveros-Rogel, M.; Salvatierra, B.; Tapia-Conyer, R; Sepúlveda-Amor, J.; Gutiérrez, G. y Ortíz-Ortíz, L., "Seroepidemiology of amebiasis in Mexico", *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* **50:** 412-419, 1994.

Calderón, J. y Ávila, E.E., "Antibody induced caps in *Entamoeba histolytica*: isolation and electrophoretic analysis", *J. Infect. Dis.,* **153:** 927-932, 1986.

Cerbón, J. y Flores, J., "Phospholipid composition and turnover of pathogenic amebas", *Comp. Biochem. Physiol.,* **69B:** 487-492, 1981.

Clark, C.G.; Cunnick, C.C. y Diamond, L.S., "*Entamoeba histolytica*: is conversion of nonpathogenic amebae to the pathogenic form a real phenomenon?", *Exp. Parasitol,* **74:** 307-314, 1992.

——— y Diamond, L.S., "Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct", *Mol. Biochem. Parasitol,* **47:** 297-302, 1991.

Cruz-Reyes, J.A. y Ackers, J.P., "A DNA probe specific to pathogenic *Entamoeba histolytica", Arch. Med. Res.,* **23:** 271-275, 1992.

De la Garza, M.; Gallegos, B. y Meza, I., "Characterization of a cytochalasin D-resistant mutant of *Entamoeba histolytica*", *J. Protozool,* **36:** 556-560, 1989.

Descoteaux, S.; Shen, P.S.; Ayala, P.; Orozco, E. y Samuelson, J., "P-glycoprotein genes of *Entamoeba histolytica*", *Arch. Med. Res.,* **23:** 23-25, 1992.

Dhar, S.K.; Choudhury, N.R.; Bhattacharya, A. y Bhattacharya, S., "A multitude of circular DNAs exist in the nucleus of *Entamoeba histolytica*", *Mol. Biochem. Parasitol,* **70:** 203-206, 1995.

Dobell, C., "Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I General introduction. II Description of the whole life history of *E. histolytica* in cultures", *Parasitology,* **20:** 357-412, 1928.

Edman, U.; Meraz, M.A.; Rausser, S.; Agabian, N. y Meza, I., "Characterization of an immuno-dominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*", *J. Exp. Med.,* **172:** 879-888, 1990.

———; Meza, I. y Agabian, N., "Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **84:** 3024-3028, 1987.

Ellis, J.E.; Setchell, K.D.R. y Kaneshiro, E.S., "Detection of ubiquinone in parasitic and free-living protozoa, including species devoid of mitochondria", *Mol. Biochem. Parasitol,* **65:** 213-224, 1994.

Espinosa-Cantellano, M.; Chávez, B.; Calderón, J. y Martínez-Palomo, A., "*Entamoeba histolytica*: electrophoretic analysis of isolated caps induced by several ligands", *Arch. Med. Res.,* **23:** 81-85, 1992.

——— y Martínez-Palomo, A., "The plasma membrane of *Entamoeba histolytica*: structure and dynamics", *Biol. Cell,* **72:** 189-200, 1991.

——— y Martínez-Palomo, A., "*Entamoeba histolytica*: Mechanism of surface receptor capping", *Exp. Parasitol,* **79:** 424-435, 1994.

Fahey, R.C.; Newton, G.L.; Arrick, B.; Overdank-Bogart, T. y Aley, S.B., "*Entamoeba histolytica*: a eukaryote without glutathione metabolism", *Science,* **224:** 70-72, 1984.

Fairlamb, A.H., "Novel biochemical pathways in parasitic protozoa", *Parasitol,* **99:** S93-S112, 1989.

Garfinkel, L.I.; Giladi, M.; Huber, M.; Gitler, C.; Mirelman, D.; Revel, M. y Rozenblatt, S., "DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes", *Infect. Immun.,* **57:** 926-931, 1989.

González-Robles, A. y Martínez-Palomo, A., "The fine structure of *Entamoeba histolytica* processed by cryo-fixation and cryo-substitution", *Arch. Med. Res.,* **23:** 73-76, 1992.

González-Ruiz, A.; Haque, R.; Rehman, T.; Aguirre, A.; Castañón, G.; Hall, A.; Guhl, F.; Ruiz-Palacios, G.; Warhurst, D.C. y Miles, M.A., "Further use of an invasive-specific monoclonal antibody against *Entamoeba histolytica*", *Arch. Med. Res.,* **23:** 281-283, 1992.

Grundy, M.S.; Voller, A. y Warhurst, D.C., "An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Entamoeba histolytica* antigens in faecal material", *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,* **81:** 627-632, 1987.

Hamann, L. y Tannich, E., "Inducible gene expression in *Entamoeba histolytica* mediated by a tetracycline responsive prokaryotic repressor", *Arch. Med. Res.,* **28(Supl.):** S32-S33, 1997.

Haque, R.; Faruque, A.S.G. y Petri, W.A., "*Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh", *Arch. Med. Res.,* **28(Supl.):** S317-S318, 1997.

Huang, M.; Albach, R.A.; Chang, K.P.; Tripathi, R.L. y Kemp, R.G., "Cloning and sequencing a putative pyrophosphate-dependent phosphofructokinase gene from *Entamoeba histolytica*", *Biochem. Biophys., Acta,* **1260:** 215-217, 1995.

Huber, M.; Garfinkel, L.; Gitler, C.; Mirelman, D.; Revel, M. y Rozenblatt, S., "*Entamoeba histolytica*: cloning and characterization of actin cDNA", *Mol. Biochem. Parasitol,* **24:** 227-235, 1987.

————; Koller, B.; Gitler, C.; Mirelman, D.; Revel, M.; Rozenblatt, S. y Garfinkel, L., "*Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules", *Mol. Biochem. Parasitol,* **32:** 285-296, 1989.

Joyce, M.P. y Ravdin, J.I., "Antigens of *Entamoeba histolytica* recognized by immune sera from liver abscess patients", *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* **38:** 74-80, 1988.

Keene, W.E.; Petitt, M.G.; Allen, S. y McKerrow, J.H., "The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*", *J. Exp. Med.,* **163:** 536-549, 1986.

Leippe, M.; Andrae, J.; Nickel, R.; Tannich, E. y Mueller-Eberhard, H.J., "Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: Isolation, primary structure y pore formation in bacterial cytoplasmic membranes", *Mol. Microbiol.,* **14:** 895-904, 1994.

Li, E.; Becker, A. y Stanley, S.L., "Chinese hamster ovary cells deficient in *N*-acetylglucosaminyltransferase I activity are resistant to *Entamoeba histolytica*-mediated cytotoxicity", *Infect. Immun.,* **57:** 8-12, 1989.

Lioutas, C.; Schmetz, C. y Tannich, E., "Identification of various circular DNA molecules in *Entamoeba histolytica*", *Exp. Parasitol,* **80:** 349-352, 1995.

Luaces, A.L. y Barret, A.J., "Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine protease of *Entamoeba histolytica*", *Biochem. J.,* **250:** 903-909, 1988.

Lushbaugh, W.B.; Hofbauer, A.F. y Pittman, F.E., "*Entamoeba histolytica*: purification of cathepsin B", *Exp. Parasitol.,* **59:** 328-336, 1985.

Martínez-Báez, M., "Historical introduction", en *Amebiasis*, Martínez-Palomo, A., ed., Elsevier, Amsterdam, 1-9, 1986.

Martínez-Palomo, A., "The Biology of *Entamoeba histolytica*", en *Tropical Medicine Research Studies Series,* Brown, K.N., ed., John Wiley & Sons, Chichester, 1982.

———, *Amebiasis*, Elsevier, Amsterdam, 1986a.
———, "Biology of *Entamoeba histolytica*", en *Amebiasis*, Martínez-Palomo, A., ed., Elsevier, Amsterdam, **2:** 11-43, 1986b.
———, "Las Amibas, Enemigos Invisibles", en *Fondo de Cultura Económica*, México, 1987.
———, "Parasitic amebas of the intestinal tract", en *Parasitic protozoa,* Kreier, J.P. y Baker, J.R., eds., Academic Press, San Diego, CA, **3:** 65-141, 1993.
———; González-Robles, A. y De la Torre, M., "Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by concanavalin A", *Nature New Biol.,* **245:** 186-187, 1973.
Mertens, E., "ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists", *Parasitol. Today,* **9:** 122-126, 1993.
Mirelman, D.; Bracha, R.; Wexler, A. y Chayen, A., "Alteration of isoenzyme patterns of a cloned culture of nonpathogenic *Entamoeba histolytica* upon changes in growth conditions", *Arch. Invest. Med.,* México, **17(Supl.):** 187-193, 1986.
Muñoz, M.L.; Calderón, J. y Rojkind, M., "The collagenase of *Entamoeba histolytica*", *J. Exp. Med.,* **155:** 42-51, 1982.
Myung, K.; Burch, D.; Jackson, T.F.H.G. y Stanley, S.L. Jr., "Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen-based ELISA", *Arch. Med. Res.,* **23:** 285-288, 1992.
Nickel, R. y Tannich, E., "Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **91:** 7095-7098, 1994.
Olvera, A.; Olvera, F.; Vines, R.R.; Recillas-Targa, F.; Lizardi, P.M.; Dhar, S.; Bhattacharya, S.; Petri, W. y Alagón, A., "Stable transfection of *Entamoeba histolytica* trophozoites by lipofection", *Arch. Med. Res.,* **28(Supl.):** S49-S51, 1997.
Orozco, E., "Pathogenesis in amebiasis", *Infect. Agents Dis.,* **1:** 19-21, 1992.
———; Báez-Camargo, M.; Gamboa, L.; Flores, E.; Valdés, J. y Hernández, F., "Molecular karyotype of related clones of *Entamoeba histolytica*", *Mol. Biochem. Parasitol,* **59:** 29-40, 1993.
———; Guarneros, G.; Martínez-Palomo, A. y Sánchez, T., "*Entamoeba histolytica*: phagocytosis as a virulence factor", *J. Exp. Med.,* **158:** 1511-1521, 1983.
Ortner, S.; Kroschewski, H.; Binder, M.; Clark, C.G.; Scheiner, O.; Wiedermann, G. y Duchene, M., "Molecular cloning and biochemical characterization of hexokinases and phosphoglucomutases from *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*", *Arch. Med. Res.,* **28(Supl.):** S81-S82, 1997.
Ostoa-Saloma, P.; Cabrera, N.; Becker, I. y Pérez-Montfort, R., "Proteinases of *Entamoeba histolytica* associated with different subcellular fractions", *Mol. Biochem. Parasitol,* **32:** 133-144, 1989.
Petri, W.A.; Chapman, M.D.; Snodgrass, T.; Mann, B.J.; Broman, J. y Ravdin, J.I., "Subunit structure of the galactose and *N*-acetyl-*D*-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica", J. Biol. Chem.,* **264:** 3007-3012, 1989.
———; Jackson, T.F.H.G.; Gathiram, V.; Kress, K.; Saffer, L.D.; Snodgrass, T.L.; Chapman, M.D.; Keren, Z. y Mirelman, D., "Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin", *Infect. Immun.,* **58:** 1802-1806, 1990.
Petter, R.; Rozenblatt, S.; Schechtman, D.; Wellems, T.E. y Mirelman, D., "Electrophoretic karyotype and chromosome assignments for a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Entamoeba histolytica*", *Infect. Immun.,* **61:** 3574-3577, 1993.

Pinto da Silva, P.; Martínez-Palomo, A. y González-Robles, A., "Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. Topochemistry and dynamics of the cell surface: cap formation and microexudate", *J. Cell Biol.,* **64:** 538-550, 1975.

Purdy, J.E.; Mann, B.J.; Pho, L.T. y Petri, W.A. Jr., "Transient transfection of the enteric parasite *Entamoeba histolytica* and expression of firefly luciferase", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **91:** 7099-7103, 1994.

Que, X. y Reed, S.L., "Nucleotide sequence of a small subunit ribosomal RNA (16S-like rRNA) gene from *Entamoeba histolytica*: differentiation of pathogenic from nonpathogenic isolates", *Nucl. Acids. Res.,* **19:** 5438, 1991.

Ramakrishnan, G.; Vines, R.R.; Mann, B.J. y Petri, W.A., "Establishment of an inducible expression system in *Entamoeba histolytica*", *Arch. Med. Res.,* **28(Supl.):** S34-S35, 1997.

Reed, S.L.; Keene, W.E. y McKerrow, J.H., "Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica", J. Clin. Microbiol.,* **27:** 2772-2777, 1989.

Rodríguez, M.; Hidalgo, M.E.; Sánchez, T. y Orozco, E., "Cloning and characterization of the *Entamoeba histolytica* pyruvate: ferredoxin oxidoreductase gene", *Mol. Biochem. Parasitol.,* **78:** 273, 1996.

——— y Orozco, E., "Isolation and characterization of phagocytosis and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*", *J. Infect. Dis.,* **154:** 27-32, 1986.

Romero, J.L.; Descoteaux, S.; Reed, S.; Orozco, E.; Santos, J. y Samuelson, J., "Use of polymerase chain reaction and nonradioactive DNA probes to diagnose *Entamoeba histolytica* in clinical samples", *Arch. Med. Res.,* **23:** 277-279, 1992.

Rosales-Encina, J.L.; Meza, I.; López de León, A.; Talamás-Rohana, P. y Rojkind, M., "Isolation of a 220 kDa protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*", *J. Infect. Dis.,* **156:** 790-797, 1987.

Ruiz-Palacios, G.; Castañón, G.; Bojalil, R.; Tercero, E.; Rausser, S.; Herbert, L.; Agabian, N. y Martínez-Palomo, A., "Low risk of invasive amebiasis in cyst carriers. A longitudinal molecular seroepidemiological study", *Arch. Med. Res.,* **23:** 289-291, 1992.

Saavedra-Lira, E. y Pérez-Montfort, R., "Cloning and sequence determination of the gene coding for the pyruvate phosphate dikinase of *Entamoeba histolytica*", *Gene,* **142:** 249-251, 1994.

Samuelson, J.; Ayala, P.; Orozco, E. y Wirth, D.F., "Emetine-resistant mutants of *Entamoeba histolytica* overexpress mRNAs for multidrug resistance", *Mol. Biochem. Parasitol,* **38:** 281-290, 1990.

Sargeaunt, P.G.; Jackson, T.F.H.G. y Simjee, A., "Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates, especially those from liver abscess", *Lancet,* **i:** 1386-1388, 1982.

Scharfetter, J.K.; Ortner, S.; Binder, M.; Wiedermann, G.; Scheiner, O. y Duchene, M., "Molecular cloning of histone H1 in *Entamoeba histolytica* and histone H2B in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar", Arch. Med. Res.,* **28(Supl.):** S14-S16, 1997.

Scholze, H.; Löhden-Bendinger, U.; Müller, G. y Bakker-Grunwald, T., "Subcellular distribution of amebapain, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*", *Arch. Med. Res.,* **23:** 105-108, 1992.

Simic, T., "Infection expérimentale de l'homme par *Entamoeba dispar* Brumpt", *Ann. Parasitol Hum. Compar.,* **9:** 385-391, 1931.

Strachan, W.D.; Spice, W.M.; Chiodini, P.L.; Moody, A.H. y Ackers, J.P., "Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*", *Lancet,* **i:** 561-563, 1988.

Tachibana, H.; Ihara, S.; Kobayashi, S.; Kaneda, Y.; Takeuchi, T. y Watanabe, Y., "Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polymerase chain reaction", *J. Clin. Microbiol.,* **29:** 2234-2239, 1991a.

———; Kobayashi, S.; Kato, Y.; Nagakura, K.; Kaneda, Y. y Takeuchi, T., "Identification of a pathogenic isolate-specific 30,000-M_r antigen of *Entamoeba histolytica* by using a monoclonal antibody", *Infect. Immun.,* **58:** 955-960, 1990.

———; Kobayashi, S.; Takekoshi, M. e Ihara, S., "Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction", *J. Infect. Dis.,* **164:** 825-826, 1991b.

Talamás-Rohana, P. y Meza, I., "Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: substrate degradation and changes in cytoskeleton organization", *J. Cell Biol.,* **106:** 1787-1794, 1988.

———; Rosales-Encina, J.L.; Gutiérrez, M.C. y Hernández, V.I., "Identification and partial purification of an *Entamoeba histolytica* membrane protein that binds fibronectin", *Arch. Med. Res.,* **23:** 119-123, 1992.

Tannich, E.; Horstmann, R.D.; Knobloch, J. y Arnold, H.H., "Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **86:** 5118-5122, 1989.

——— y Burchard, G.D., "Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified *in vitro*", *J. Clin. Microbiol.,* **29:** 250-255, 1991.

Torres Guerrero, H.; Peattie, D.A. y Meza, I., "Chromatin organization in *Entamoeba histolytica", Mol. Biochem. Parasitol.,* **45:** 121-130, 1991.

Trissl, D.; Martínez-Palomo, A.; De la Torre, M.; De la Hoz, R. y Pérez de Suárez, E., "Surface properties related to concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several Entamoeba strains", *J. Exp. Med.,* **145:** 652-665, 1977.

Vargas-Villarreal, J.; Martinez-Rodriguez, H.; Castro-Garza, J.; Mata-Cardenas, B.D.; Gonzalez-Garza, M.T. y Said-Fernandez, S., "Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and lysophospholipase L(1) activities", *Parasitol Res.,* **81:** 320-323, 1995.

Vázquez-Prado, J. y Meza, I., "Fibronectin receptor in *Entamoeba histolytica*: purification and association with the cytoskeleton", *Arch. Med. Res.,* **23:** 125-128, 1992.

Weinbach, E.C., "Biochemistry of enteric parasitic protozoa", *Trends Biochem. Sci.,* **6:** 245-257, 1981.

Yang, W.; Li, E.; Kairong, T. y Stanley, S.L. Jr., "*Entamoeba histolytica* has an alcohol dehydrogenase homologous to the multifunctional *adhE* gene product of *Escherichia coli", Mol. Biochem. Parasitol.,* **64:** 253-260, 1994.

Capítulo 25

Drosophila COMO ORGANISMO MODELO EN LA BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Rosario Rodríguez Arnaiz



Introducción

En la caracterización de un organismo como modelo está implícito el supuesto de que, al conocer su biología, ésta pueda explicar al menos en parte, la de otros seres vivos. Al estudiar procesos como el desarrollo y compararlos en diferentes organismos se puede encontrar, por una parte, que existen genes altamente conservados en organismos muy distantes desde el punto de vista evolutivo y, por otra parte, encontrar genes que sólo se presentan en un linaje. Ejemplos de ello son los receptores para las tirosincinasas que se encuentran en todos los metazoarios y los genes que codifican para las inmunoglobinas que se presentan solamente en el sistema inmune de los vertebrados (Miklos y Rubin, 1996). De modo que los organismos llamados modelo como el insecto *Drosophila melanogaster*, el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el mamífero *Mus musculus*, el hongo *Saccharomyces cerevisiae* y la planta *Arabidopsis thaliana*, comparten el hecho de que se conoce ampliamente su genética y su posición filogenética en un marco evolutivo amplio.

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (figura 25-1), ha sido empleada como organismo para el estudio de la genética, desde el nacimiento de esta disciplina a principios del siglo XX. Las investigaciones iniciales las realizó en 1909 el Dr. Thomas Hunt Morgan en la Universidad de Columbia, Nueva York. Un año después, Morgan describe el aislamiento del mutante que produce color de ojos blanco (*w-white*) y demuestra que esta característica está ligada al sexo. En 1915, Morgan y tres de sus principales estudiantes, A.H. Sturtevant, H.J. Muller y C.B. Bridges, comprueban experimentalmente la teoría cromosómica de la herencia y publican el libro, ya clásico, sobre los *Mecanismos de la herencia Mendeliana,* en el que se establece la relación paralela entre el comportamiento de los genes y de los cromosomas durante la meiosis. Durante cerca de 90 años de intensa investigación, se ha logrado obtener una gran cantidad de información sobre diversos procesos biológicos fundamentales, tanto en el ámbito celular como en el del desarrollo, que son comunes a muchos eucariontes. Muchos conceptos básicos de la genética clásica, la molecular y la evolutiva se han obtenido

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, ha sido empleada como organismo para el estudio de la genética, desde el nacimiento de esta disciplina a principios del siglo XX.

empleando a *Drosophila* como organismo en la biología experimental. Además, el cúmulo de conocimientos generados sobre la estructura y la función del genoma de *Drosophila*, así como de diversos procesos esenciales de la biología, tales como el patrón de formación del embrión, el desarrollo y funciones de los órganos de los sentidos y del sistema nervioso, han propiciado el que la mosca de la fruta se considere un organismo modelo (Rubin, 1988).

Las ventajas que la mosca de la fruta tiene, para poder realizar con este organismo investigaciones sobre biología celular y evolutiva, son entre otras la de ser un ser vivo de tamaño pequeño, con un ciclo de vida corto, ya que dura aproximadamente 10 días a 25 ºC con una humedad relativa de 60%, hechos que son relevantes para el análisis genético, ya que permiten cultivar un gran número de organismos en espacios reducidos y obtener varias generaciones en poco tiempo. El hecho de que *Drosophila* sea un eucarionte holometábolo, con el cual es posible realizar todos los experimentos con el organismo intacto, es decir, *in vivo*, constituye una ventaja adicional. Aspectos cruciales como las interacciones con el ambiente o los contactos célula-célula no pueden entenderse cuando se trabaja con células o tejidos que derivan de organismos multicelulares cultivados *in vitro* (Rodríguez-Arnáiz y Ramos, 1992).

El hecho de que *Drosophila* sea un eucarionte holometábolo, con el cual es posible realizar todos los experimentos con el organismo intacto, es decir, *in vivo*, constituye una ventaja adicional.

En *Drosophila* el fenómeno de pleiotropía —la mutación en un solo gen que produce efectos en cascada en el organismo— es la regla más que la excepción en la expresión de los genes; en términos moleculares, la pleiotropía se produce cuando una proteína (o el RNA) se requiere funcionalmente en lugares distintos, y/o en tiempos diferentes o ambos. Por ejemplo, la expresión de la proteína transmembranal *Notc*h está involucrada con diferentes ligandos en interacciones célula-célula, en tejidos diversos y en una gran variedad de procesos de regulación de la expresión genética (Artavanis-Tsakonas y cols., 1985). En un análisis a gran escala realizado para conocer los requerimientos funcionales para la formación del ojo, se encontró que 70% de los genes son necesarios para construir cada uno de estos órganos (Thaker y Kankel, 1992).

En *Drosophila* el fenómeno de pleiotropía —la mutación en un solo gen que produce efectos en cascada en el organismo— es la regla más que la excepción en la expresión de los genes.

Con *Drosophila* es posible, además, trabajar con todos los genes que pueden mutar para producir un fenotipo. El fenotipo puede ser característico del ensayo que se realice. La mayoría de estos análisis rastrean mutaciones que afectan tanto la viabilidad como la morfología del adulto o bien aspectos del desarrollo. El análisis morfológico ha avanzado tanto que hoy es posible conocer mediante el empleo de anticuerpos la respuesta específica a nivel celular. Se han establecido ensayos que afectan la ovogénesis, la determinación del sexo, la percepción sensorial y el aprendizaje, entre otros. Estos ensayos permiten identificar, sin sesgos, a los genes funcionales que se expresan para formar una estructura o para llevar a cabo un proceso biológico particular. Por ello, aunque el fenómeno sea extremadamente complejo, no se requiere un conocimiento previo de la naturaleza bioquímica del mismo, de modo que, por ejemplo, en el patrón de formación del embrión, ha sido posible disectar genéticamente los componentes individuales que intervienen en el proceso (Banfi y cols., 1997).

Las mutaciones en muchos genes importantes suelen ser letales. En *Drosophila* es relativamente sencillo mantener cepas en el laboratorio que porten genes recesivos, que al hacerse homocigotos pueden producir tanto esterilidad como la muerte del organismo. Se han descrito cerca de 5,000 genes que producen un efecto fenotípico (Lindsley y Zimm, 1992). Además, se han identificado a la fecha más de 11,000 *loci* génicos y 38,000 alelos (incluidos los múltiples), la mayoría de los cuales ha sido clonada empleando técnicas como la caminata cromosómica y los transpones marcados (Rubin, 1996). La reciente obtención del mapa físico y de la secuenciación de la región eucromática del genoma de *Drosophila melanogaster* servirá como materia prima para desentrañar los mecanismos moleculares que subyacen en diversos procesos del desarrollo, el comportamiento y el envejecimiento que son comunes a los eucariontes, para los cuales la mosca de la fruta es un modelo. Asimismo permitirá identificar genes adicionales así como conocer sus funciones biológicas (Adams y cols., 2000).

> La reciente obtención del mapa físico y de la secuenciación de la región eucromática del genoma de *Drosophila melanogaster* servirá como materia prima para desentrañar los mecanismos moleculares que subyacen en diversos procesos del desarrollo, el comportamiento y el envejecimiento.

Una vez que se identifica la mutación de interés, ésta puede analizarse por métodos genéticos regulares, tales como las pruebas de complementación génica, las que permiten establecer el número de genes involucrados en el proceso. Además, pueden estudiarse los fenotipos de los individuos que portan mutaciones en más de un gen con el propósito de inferir las jerarquías en la función de los genes. Es posible también localizar la posición cromosómica relativa de un gen mutado, midiendo la frecuencia de recombinación meiótica entre un gen marcador y una mutación, o bien localizarlo en el mapa citológico mediante hibridación *in situ*.

> Las pruebas de complementación génica, las que permiten establecer el número de genes involucrados en el proceso.

Los aspectos del desarrollo y función de los genes pueden estudiarse en organismos mosaico, es decir, individuos que portan clones de células somáticas genéticamente alteradas. Estos clones pueden producirse por pérdida cromosómica, mutación o recombinación mitótica y pueden reconocerse mediante el empleo de marcadores genéticos específicos. La utilización de mosaicos ha permitido construir los mapas de destino que marcan la posición relativa de células precursoras en el embrión temprano, que producirán estructuras particulares en el adulto. Además, el análisis de los individuos mosaico ha permitido establecer procesos tales como la autonomía celular en la acción de los genes, el número de células fundadoras, los patrones de crecimiento y las restricciones en el destino celular (García-Bellido y Merriam, 1969).

Los mosaicos se emplean también para estudiar a los genes que, cuando mutan, producen la muerte del individuo. El gen en cuestión puede ser necesario para todas las células del organismo o bien para un tipo celular específico. Las células de los clones suelen ser homocigotas, ya que se originan a partir de procesos como la recombinación mitótica, la pérdida cromosómica o la mutación, y coexisten en un contexto de células heterocigotas. Si el gen es doméstico y, por lo tanto, todas y cada una de las células lo requieren para su mantenimiento, entonces no sobrevivirán las células y no se observarán clones. Por el contrario, si se observan clones, el gen no será esencial para la sobrevivencia del organismo (Rubin, 1988).

La recombinación mitótica generalmente ocurre en frecuencias muy bajas, pero puede inducirse mediante el empleo de rayos X o de mutágenos

químicos. Si la radiación se aplica en momentos precisos del desarrollo, entonces, es posible controlar el tiempo en el que se inducen los clones marcados. Al observar las células marcadas durante el desarrollo del organismo, puede estudiarse el papel de los patrones de crecimiento celular o de restricción de los mapas de destino. Al generar tales clones, en moscas portadores de mutaciones particulares, se puede analizar el papel que desempeñan otros genes en el control de los patrones bajo estudio. Así, si los clones se inducen después de la formación del blastodermo en la región posterior del ala, se observa que no se afecta la región anterior, lo que indica que la restricción en el eje se había ya establecido. Sin embargo, cuando los mismos clones se inducen en animales que portan una mutación en el gen *engrailed* y no se observa la restricción en el linaje, ello indica que la función del gen *engrailed* se requiere para establecer y mantener la restricción en el eje antero-posterior (García-Bellido y Dapena, 1974).

Muchos sistemas genéticos, como la respuesta celular al choque térmico y a las hormonas esteroideas, fueron originalmente descubiertos en este organismo, y hoy día se sabe que son importantes para los vertebrados. A nivel de los genes, las secuencias que codifican para las cajas homeóticas representan genes de importancia fundamental para entender los procesos de regulación de la transcripción y éstos fueron descubiertos en *Drosophila*. Los genes *boss* y *ser*, que controlan la diferenciación de uno de los fotorreceptores de las células de los ojos, son de los mejores ejemplos descritos en cuanto a la interacción de ligandos y receptores de la biología del desarrollo.

Las mutaciones de *Drosophila* son herramientas esenciales para el análisis funcional de los genes.

Así que, al descubrir los genes de un organismo complejo pero dúctil, se logra el acceso a un lenguaje funcional común a toda la biología. Por otro lado, las mutaciones de *Drosophila* son herramientas esenciales para el análisis funcional de los genes, de los que en vertebrados sólo se tienen clones. Usualmente se emplean sondas de los vertebrados para obtener secuencias similares en este organismo, de modo tal que al mapear las secuencias de *Drosophila* es posible correlacionar el gen con una mutación existente, o bien seleccionar una nueva mutación con la secuencia para demostrar su función.



El genoma de *Drosophila*

El complemento cromosómico

El número cromosómico de *Drosophila melanogaster* es de cuatro cromosomas.

El cromosoma mayor de este organismo es más o menos del tamaño del cromosoma humano más pequeño.

El número cromosómico de *Drosophila melanogaster* es relativamente pequeño, ya que cuenta con cuatro cromosomas, todos ellos bien mapeados por recombinación (mapa genético) y secuenciados mediante herramientas como la clonación y la bioinformática (mapa físico). El cromosoma X (cromosoma 1) es acrocéntrico, el cromosoma Y es submetacéntrico, los autosomas 2 y 3 son metacéntricos y muy grandes, mientras que el cromosoma 4 es acrocéntrico muy pequeño, casi puntual. El cromosoma mayor de este organismo es más o menos del tamaño del cromosoma humano más pequeño. Cada brazo cromosómico, excepto el del cromosoma 4, tiene una

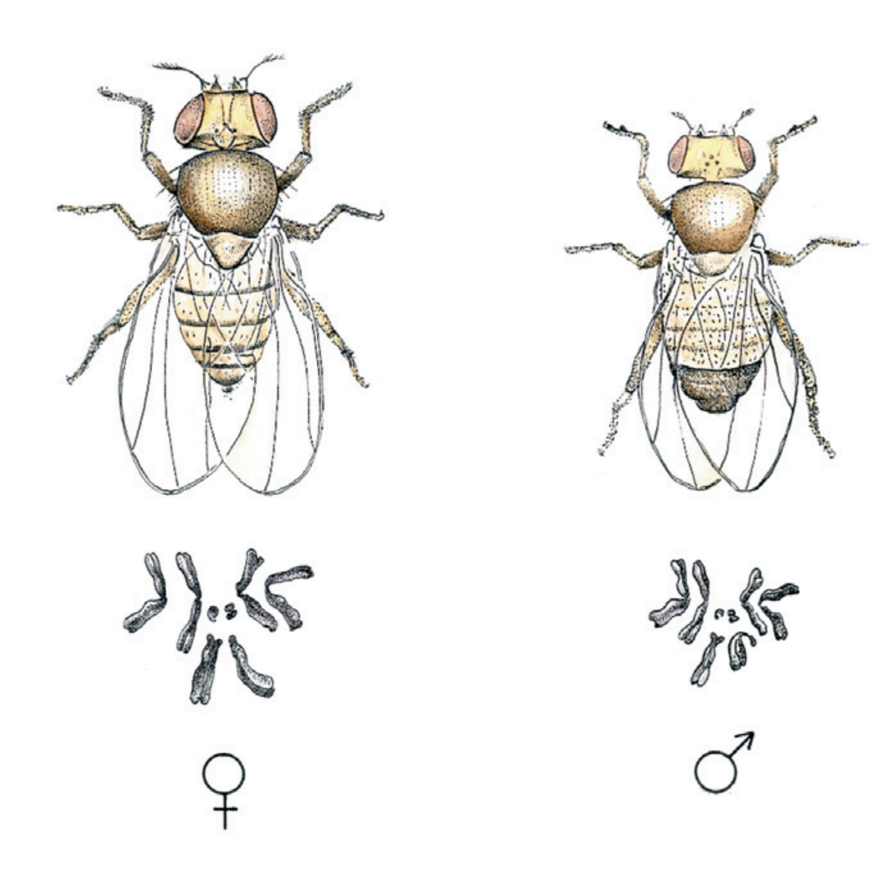


Figura 25-1. Esquema de la hembra/♀ y del macho/♂ de los cromosomas en metafase de *Drosophila melanogaster*. (Dibujo del Biól. Aldi de Oyarzábal.) Esta figura la puede apreciar en el pliego de color al final del libro. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

longitud de 2.5 μm. En los autosomas se encuentra un bloque pericéntrico de heterocromatina constitutiva, que corresponde a 25% de la cromatina. El cromosoma X es heterocromático en 50%, mientras que el cromosoma Y es casi completamente heterocromático y el cromosoma 4 es totalmente heterocromático (figura 25-1). Se ha estimado el contenido de DNA de cada cromosoma; así, el cromosoma X contiene 2.6×10^{10} D; el cromosoma 2: 4×10^{10} D; el cromosoma 3: 4.3×10^{10} D, y el cromosoma 4: 0.4×10^{10} D (Ashburner, 1989).

Los cromosomas politénicos

Los cromosomas gigantes o politénicos tienen una longitud en los brazos de los cromosomas mayores del genoma de alrededor de 400 μm, se encuentran en diversos tejidos de los dípteros, tales como las glándulas salivales, los tubos de Malpighi, las células de los cuerpos grasos y las células nutritivas. Los cromosomas de estas células sufren un proceso de endorreduplicación, en el cual el DNA se replica más de 10 veces sin que la célula se divida por mitosis. En la interfase, las cromátidas hermanas se mantienen unidas y precisamente alineadas. En este proceso sólo la eucromatina y la heterocromatina beta (β) se politenizan, mientras que la heterocromatina alfa (α) y el cromosoma Y no se replican, formando

Los cromosomas gigantes o politénicos tienen una longitud en los brazos de los cromosomas mayores del genoma de alrededor de 400 μm, se encuentran en diversos tejidos de los dípteros, tales como las glándulas salivales, los tubos de Malpighi, las células de los cuerpos grasos y las células nutritivas.

un cromocentro difuso del que se proyectan los cromosomas politenizados. Cada brazo politenizado muestra un patrón de bandeo característico con concentraciones locales de cromatina espiralizada (Merriam y cols., 1991).

Este patrón único provee un mapa físico de alta resolución de los cromosomas politénicos (Bridges, 1935). Este investigador demostró, a través de rearreglos, que el bandeo cromosómico es colinear al mapa genético que se había obtenido por recombinación. Bridges, además, estableció un sistema coordinado, que por cierto todavía se emplea, para indicar la localización de los genes en el mapa politénico. El genoma está dividido en 102 secciones llamadas divisiones, cada división se subdivide y numera secuencialmente en 6 subdivisiones que se denotan con letras. El número total de bandas es de 5,194; el tamaño de cada sección politenizada es de 110,000 kilobases (kb) (figura 25-2).

Los cromosomas politénicos de las glándulas salivales son sustratos ideales para la hibridación *in situ*, técnica que emplea sondas marcadas de ácidos nucleicos. La resolución de esta metodología se ha venido mejorando notablemente. Al principio se lograban localizaciones al nivel de las subdivisiones, cuyo tamaño promedio es de 200 kb. Al emplear sondas marcadas con biotina, la resolución es a nivel de una banda, lo que equivale a un tamaño promedio de 20 kb (Rubin, 1988).

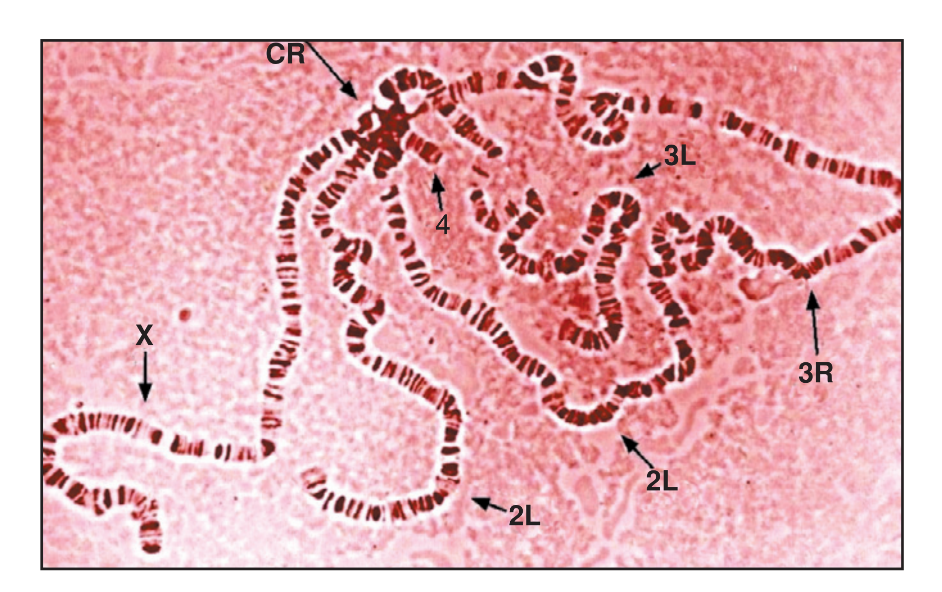


Figura 25-2. Esquema de los cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster*. X: cromosomas X con 983 bandas, 22.8 Mb, secciones 1-40; 2L: brazo izquierdo del cromosoma 2 con 874 bandas, 18.3 Mb, secciones 21-40; 2R: brazo derecho del cromosoma 3 con 1,063 bandas, 22.8 Mb, secciones 41-60; CR: cromocentro, 55 Mb, contiene los centrómeros y la heterocromatina constitutiva; 3L: brazo izquierdo del cromosoma 3 con 1,034 bandas, 21.2 Mb, secciones 61-80; 3R: brazo derecho del cromosoma 3 con 1,200 bandas, 24.1 Mb, secciones 81-100; 4: cromosoma 4 con 40 bandas, 1.3 Mb, secciones 101-102. Tomado de web.bro.utk.edu/general/sg0101/october4.hmtl. *Véase* el encarte al final del libro donde se incluye esta figura a color.

Tamaño del genoma

El contenido de DNA en el genoma haploide de *Drosophila melanogaster* es de 0.18 picogramos equivalente a 165,000 kb (165 megabases, Mb) u 11×10^{10} D (Rasch y cols., 1971), mientras que el de los seres humanos se ha calculado en 3,000 Mb, es decir, que es 5.5 veces mayor que el de *Drosophila*. El número de genes en la mosca de la fruta se estimó que oscilaba entre 5,000 sobre la base del número de mutaciones letales, y de entre 8,000 y 20,000 sobre la base de los genes necesarios para el desarrollo (Nusslein-Volhard, 1994). Es decir, se postuló una diferencia de 4 veces en relación con el número de genes que mutan sin producir un efecto fenotípico. Sin embargo, con la dilucidación de la secuencia eucromática del genoma, el número estimado de genes que codifican para proteínas resultó ser de 13,601 (Adams y cols., 2000).

El contenido de DNA en el genoma haploide de *Drosophila melanogaster* es de 0.18 picogramos equivalente a 165,000 kb.

El número estimado de genes que codifican para proteínas resultó ser de 13,601.

Eucromatina y heterocromatina

El término de heterocromatina fue acuñado por Heitz (1928) para distinguir, a las regiones de los cromosomas que se tiñen intensamente con colorantes básicos, de las regiones que no se tiñen tan intensamente. Las diferencias en la estructura y organización de la cromatina propuesta por este autor mostraron años después profundas diferencias en las funciones que llevan a cabo.

El genoma haploide de *Drosophila melanogaster* consiste en dos compartimentos: la zona rica en heterocromatina y pobre en genes compuesta por 50 Mb (1/3 del genoma) y la zona eucromática rica en genes que comprende 110 Mb (2/3 partes). La eucromatina se descondensa durante la interfase y por ello es invisible con un microscopio de observación. El 80% de la eucromatina corresponde a secuencias que codifican para copias simples de DNA. El 20% restante está formado por secuencias moderadamente repetidas, la mayoría de las cuales corresponden a diversas familias de elementos genéticos transponibles (John y Miklos, 1988).

El genoma haploide de *Drosophila melanogaster* consiste en dos compartimentos: la zona rica en heterocromatina y pobre en genes compuesta por 50 Mb (1/3 del genoma) y la zona eucromática rica en genes que comprende 110 Mb (2/3 partes).

La heterocromatina está formada por DNA repetitivo del que se distinguen dos tipos: alfa (α) y beta (β). La heterocromatina α se encuentra alrededor del centrómero, mientras que la β forma un lindero difuso con la eucromatina. Estas distinciones en la estructura son consecuencia de las diferentes familias de DNA repetitivo que se encuentran en cada una de ellas. De 18 a 21% del DNA consiste en heterocromatina α, lo que corresponde a secuencias simples altamente repetidas que se localizan en el DNA satélite. Entre 9 y 12% del DNA es moderadamente repetitivo, lo que corresponde a familias de genes repetidas tales como los genes que codifican para las histonas y el RNA ribosomal, y también a secuencias de elementos movibles transponibles cuyo número de copias y localización en el genoma no es fijo. La heterocromatina β está formada por secuencias moderadamente repetidas que se localizan en la eucromatina (Merriam y cols., 1991).

La heterocromatina está formada por DNA repetitivo del que se distinguen dos tipos: alfa (α) y beta (β).

Eucromatina

La capacidad de codificación del genoma de *Drosophila* hacia un producto proteico terminal ha sido tema de intenso debate. Preguntas como, ¿cuántos genes son necesarios para el desarrollo y las funciones que se llevan a cabo en el organismo?, ¿qué fracción del DNA genómico codifica para estos genes? Una aproximación para responder a estas preguntas se ha hecho estimando la proporción de mutaciones que se presentan en genes particulares y una conjetura de la fracción de genes que pueden mutar para producir un letal recesivo. El dato que ello arroja es de 5,000 genes. Una segunda aproximación se ha hecho con base en el número de bandas que se encuentran en los cromosomas politénicos de las glándulas salivales, lo que resulta también en un número aproximado de 5,000 genes (Rubin, 1988). La tercera aproximación se obtuvo una vez secuenciada la región eucromática del genoma de *Drosophila melanogaster*, lo que arrojó un número de 13,601 genes que codifican para un producto y de 14,113 transcritos que se generan a través del empalme alternativo de algunos genes (Adams y cols., 2000).

Hace unos cuantos años se determinaron los tamaños de las unidades de transcripción mediante el análisis de cDNA informados en la literatura; de ellos, 278 se pudieron alinear con el DNA genómico. Estas unidades de transcripción se obtuvieron a partir de mutaciones inducidas por radiaciones ionizantes y por agentes químicos, por inserción de transposones, mediante ensayos de caminata cromosómica, por similitud entre secuencias moleculares y por ensayos de mutagénesis diseñados para aislar mutantes que afectan el comportamiento y que alteran la anatomía del cerebro. En este estudio, se definieron las unidades genómicas de transcripción sobre la base de las que producen una o más proteínas que comparten los mismos exones; los transcritos múltiples que se originan por poliadenilación o por empalmes alternativos se consideraron como una unidad de transcripción. Al alinear las 278 unidades de transcripción en la base de datos genómica, se encontró que ocupan 2.4 Mb del DNA genómico; si éstas se encuentran en los 110 Mb de la eucromatina, entonces ésta contiene 13,200 unidades de transcripción. Otra aproximación consistió en utilizar sólo los ejemplos en los que dos unidades de transcripción contiguas están tan pegadas que se incluye al DNA que se encuentra entre ellas. El dato que se obtuvo fue de 158 unidades de transcripción embebidas en 1.7 Mb de DNA, lo que corresponde a 11,000 unidades de transcripción. Si se comparan estos datos con los del protozoario unicelular *Oxytricha similis* y con los del nematodo *Caenorhabditis elegans,* cuyo número de genes oscila entre 12,000 y 14,000, se podría pensar que estas unidades de transcripción no reflejan las notables diferencias en complejidad morfológica que tienen la mosca de la fruta, el protozoario y el nematodo. Es decir, el número de genes no es una medida de la complejidad biológica de un organismo, se piensa más bien que el aumento en el promedio de DNA de una unidad genética (de 1 kb en bacterias a 10 kb en *Drosophila*) refleja la necesidad de elementos reguladores en *cis* (Miklos y Rubin, 1996).

La presencia de intrones en los genes, así como de grandes regiones reguladoras en algunos genes, lleva implícito el hecho de que los genes son

significativamente más largos que la cantidad de DNA que se requiere para la codificación del producto terminal. Para evaluar las funciones de las secuencias reguladoras es necesario identificar las que están evolutivamente conservadas; así, al comparar las secuencias promotoras de cuatro genes que codifican para la rodopsina en *Drosophila melanogaster* y en *Drosophila virilis* se encontraron grupos de secuencias principales conservadas así como de secuencias por arriba de los genes que confieren especificidad celular. Al analizar las 31 secuencias reguladoras en estudios de mutagénesis dirigida, se encontró que 7 de las 8 secuencias conservadas están comprometidas con la función, mientras que ninguna de las 23 secuencias no conservadas perturban la función normal cuando están alteradas (Fortini y Rubin, 1990).

Se han descrito tres secuencias promotoras en los genes en *Drosophila*. Éstas son 1) *la caja TATA*, que se localiza a -25/-30 pares de bases del sitio de unión de la RNA-polimerasa; 2) *la secuencia de iniciación (Inr*) que se encuentra en la vecindad del sitio de unión de la polimerasa y que regula algunos aspectos de la transcripción, y 3) el recientemente descrito *elemento promotor proximal* que se encuentra entre 20 y 30 pares de bases por abajo del sitio de unión de la RNA-polimerasa II. *La caja TATA* está presente sólo en 50% de los genes, por regla general en los genes estructurales, muchos de los cuales son inducibles. Por el contrario, las secuencias promotoras de los genes regulados no suelen tener caja TATA, hecho que permite discriminar, al menos en parte, entre la expresión de los genes estructurales y de los genes que actúan durante el desarrollo. *La secuencia Inr* está representada por un solo tipo de elemento con una secuencia consenso TCAGT presente en 112 artrópodos estudiados, y ausente en el DNA de los seres humanos (Penotti, 1990). *El elemento promotor proximal* representa tanto el sitio de unión de algunos factores nucleares como de pausa para la RNA-polimerasa II durante la transcripción; aparentemente es un sitio promotor exclusivo del genoma de *Drosophila*, que se encuentra fuertemente sobrerrepresentado en los genes que no contienen la caja TATA (Arkhipova, 1995).

Se han descrito tres secuencias promotoras en los genes en *Drosophila*.

Heterocromatina

El genoma de *Drosophila* contiene aproximadamente 60 kb de heterocromatina. La heterocromatina constitutiva se refiere a las partes del genoma que permanecen relativamente condensadas durante el ciclo celular y que se replican tardíamente durante la fase S. En general, la heterocromatina constitutiva contiene familias múltiples de secuencias repetidas que se presentan en niveles variados de reiteración. Existe una baja densidad de genes en la heterocromatina, en relación con la longitud física que ocupa en los cromosomas. La heterocromatina, además de contener al centrómero, realiza funciones diversas tales como desempeñar un papel esencial en la organización estructural del núcleo en la interfase y en la segregación de los cromosomas durante las divisiones mitótica y meiótica. Se han asignado diversas funciones a la heterocromatina de los cromosomas X y

El genoma de *Drosophila* contiene aproximadamente 60 kb de heterocromatina.

Y, entre ellas la de contener bloques de genes que se repiten en tándem y que codifican para el RNA ribosomal. El cromosoma Y es en *Drosophila* casi completamente heterocromático, sólo contiene seis genes que codifican para la fertilidad del macho (Brousseau, 1960). La heterocromatina de los cromosomas 2 y 3 contiene alrededor de 30 genes que son necesarios para la viabilidad.

La heterocromatina está asociada con el fenómeno conocido como efecto de posición, ya que los genes que se encuentran en la zona de transición de la eucromatina, pero cerca de la heterocromatina, se expresan de forma diferente en cada célula. Si el patrón de expresión diferencial puede detectarse en el fenotipo, entonces se observará moteado o variegado. La expresión variable de los genes de la eucromatina que se localizan en la vecindad de la heterocromatina se correlaciona con los cambios estructurales de la cromatina por la presencia en ellos de la proteína no histónica HP1, por cierto muy conservada en la evolución (Clark y Elgin, 1992). La irregularidad en la expresión de los genes eucromáticos cercanos a la heterocromatina, se observa también cuando los genes que se encuentran normalmente en la heterecromatina, se relocalizan en la eucromatina.

La heterocromatina no es pues la región cromosómica donde se encuentra la basura genética y que consiste en diversas secuencias repetidas en tándem, interrumpida ocasionalmente por genes funcionales y por transposones defectuosos. La heterocromatina tiene una estructura genética muy compleja, que consiste en islas de secuencias únicas, muchas de las cuales contienen regiones codificantes, interesparcidas con bloques de DNA satélite. Aun en especies muy cercanas, la cantidad de heterocromatina y la naturaleza de las secuencias satélite puede variar en forma dramática sin que aparentemente se produzcan efectos sobresalientes en el tiempo que dura el desarrollo, en la morfología del adulto ni en la viabilidad del organismo (Miklos, 1985). Algunas secuencias heterocromáticas desempeñan un papel muy importante en la recombinación y en el proceso de compensación de dosis (Lowenhaupt y cols., 1989).

Organización molecular del genoma

El genoma de *Drosophila melanogaster* está organizado molecularmente en tres tipos de secuencias.

Mediante la metodología de cinética de reasociación, se ha podido establecer que el genoma de *Drosophila melanogaster* está organizado molecularmente en tres tipos de secuencias (Crain y cols., 1976). *Las secuencias únicas* que corresponden a 110 Mb (alrededor de 66%), *las secuencias moderadamente repetidas* que corresponden a una fracción de 20 Mb (12% del genoma) y *las secuencias sencillas altamente repetidas* que corresponden alrededor de 35 Mb (20% del genoma).

De *las secuencias moderadamente repetidas*, cerca de 5 Mb corresponden a las secuencias que codifican para las histonas y para los genes del RNA 5S y del rRNA. El resto, es decir, alrededor de 15 Mb, consiste en copias múltiples de diversas familias de elementos genéticos transponibles, cuya localización en el genoma y número de copias varía de cepa a cepa. En relación a los transposones, tres hechos son particularmente distintivos en *Droso-*

phila: a) el número de copias de la mayoría de las familias repetidas es inusualmente bajo en este organismo; de ellas, más de 50% corresponde a los elementos móviles transponibles; se sabe que existen alrededor de 50 copias de cada uno; b) a diferencia de las que se encuentran en el genoma de los mamíferos, en *Drosophila* no existen secuencias altamente repetidas como los elementos nucleares interespaciados (semejante a las secuencias Alu), y c) la distribución de las secuencias repetidas sigue un patrón de separación largo con una distancia entre los elementos repetidos mayor a 5 kb (Berg y Howe, 1989).

Los transposones, de acuerdo al mecanismo de transposición, pueden dividirse en dos tipos: 1) *los que se transponen mediante transcripción inversa a una molécula intermedia de RNA*, y 2) *los que se transponen directamente al DNA*.

Transposición mediante transcripción inversa a una molécula intermedia de RNA. De este tipo de retrotransposones, se conocen dos tipos: a) los que contienen secuencias semejantes a los retrovirus, y b) los retrotransposones no virales.

a) En los retrotransposones se encuentran dos marcos de lectura abiertos que codifican uno para una proteína precursora, que genera los constituyentes de la cápside viral, y otro que codifica para una proteína precursora cuyos productos ya separados corresponden a la transcriptasa inversa y a la integrasa. Entre las superfamilias de estos retrovirus, se encuentran las *copia* y *gypsy*, ambas además ampliamente distribuidas entre los invertebrados y las plantas superiores. En *Drosophila,* la familia de transposones *gypsy*, también conocida como mdg4, contiene tres marcos abiertos de lectura, uno de los cuales codifica para un producto que es muy semejante al gen *gag* de los retrovirus. Éste produce una proteasa específica, la transcriptasa inversa, y una endonucleasa. Además, codifican para otro producto similar al del gen *env* de los retrovirus que es el responsable de la infección. De modo que el retrotransposón *gypsy* es infeccioso y se transmite de forma horizontal (Kim y cols., 1994).

b) Los retrotransposones no virales contienen secuencias que codifican para la transcriptasa inversa.

Las familias de elementos móviles que se trasponen directamente de DNA a DNA. Son secuencias que codifican para la transposasa, enzima que se requiere para su transposición. Éstas incluyen a los elementos P y a la familia *mariner* que se encuentra en muchos insectos.

Además, recientemente se ha descrito que los telómeros están compuestos por elementos transponibles específicos *(HeT-A y TART*) de esta región cromosómica, cuya función particular es la de elaborar la parte final de los cromosomas. En contraste con lo que ocurre en la mayoría de los protozoarios, hongos, plantas, animales y mamíferos, en los que los telómeros se extienden por la acción de una enzima, la telomerasa, que emplea un segmento de su propio RNA como templete, en *Drosophila* los telómeros se construyen mediante estos retrotransposones que sólo se encuentran y se transponen en esta región; no existen evidencias de que salten a genes

vecinos. Además, al encontrarse sólo en regiones heterocromáticas se postula que estos elementos deben contener secuencias que podrían ser los motivos estructurales para la formación de la heterocromatina y ésta a su vez funciona, al menos en parte, para mantener a los telómeros (Pardue y cols., 1996).

Los elementos transponibles pueden además estar involucrados en los procesos iniciales que producen rearreglos cromosómicos como translocaciones, inversiones y deleciones. Estos rearreglos pueden afectar al patrón de expresión de los genes o, en su caso, a la herencia de grupos completos de genes.

Las secuencias simples altamente repetidas corresponden a 35 Mb del genoma de *Drosophila*. Éstas se conocen como DNA-satélite (satDNA), ya que, al extraer el DNA de las células y someterlo a centrifugación diferencial en gradiente de cloruro de cesio, se obtiene una banda adicional (satélite).

En el genoma de *Drosophila melanogaster* existen dos organizadores nucleolares (ON), uno en el cromosoma X y otro en el brazo corto del cromosoma Y.

En el genoma de *Drosophila melanogaster* existen dos organizadores nucleolares (NOR), uno en el cromosoma X y otro en el brazo corto del cromosoma Y. En los ON se encuentran las secuencias que codifican para los RNA ribosomales mayores: 18S y 28S. El rRNA 5S es codificado por un gen que se encuentra en el brazo derecho del cromosoma 2 (banda 56 F1-9). Los genes 18S y 28S están arreglados en copias repetidas en tándem o en forma inversa; se encuentran alrededor de 250 copias en el X y cerca de 200 en el Y. Estas copias corresponden a ≅ 0.5% del total del DNA del genoma diploide. Algunas unidades de rDNA en varias cepas están interrumpidas por espaciadores intragénicos de longitud variada de aproximadamente 5.7 ± 1.9 kb en el cromosoma X y de entre 4 y 7.6 kb en el Y. Este DNA espaciador es muy rico en AT (71%) (Ashburner, 1989).

Los genes que codifican para la subunidad 5S están agrupados en el cromosoma 2R y arreglados en forma de secuencias moderadamente repetidas. Los genes que codifican para los tRNA también están agrupados; han sido mapeados por hibridación *in situ* con sondas radiactivas marcadas en los cromosomas politénicos; muchos de ellos contienen secuencias que codifican para varios tRNA; así, en el cromosoma 2R (banda 42A) se encuentran 18 genes y todos ellos codifican para aminoácidos básicos. La mayoría de los genes que codifica para los tRNA no contiene intrones. Sin embargo, existen algunas excepciones como los genes que codifican para el tRNAtyr que sí contienen intrones con longitudes de entre 20 y 113 pares de bases. Cabe hacer notar que los pseudogenes son extremadamente raros en el genoma de *Drosophila*; sólo se conoce uno para el tRNAmet y varios para las snRNA. Se postula que éstos probablemente se originaron por intercambios debido a que conservan los intrones (Ashburner, 1989).

El DNA mitocondrial (mtDNA) en *Drosophila melanogaster* es rico en AT.

El genoma mitocondrial codifica para enzimas de la cadena respiratoria, de los citocromos b y c oxidasas.

El DNA mitocondrial (mtDNA) en *Drosophila melanogaster* es rico en AT (79%); la orientación de los genes con respecto al origen es diferente a la que se presenta en el genoma mtDNA de los mamíferos. El genoma mitocondrial codifica para enzimas de la cadena respiratoria, de los citocromos b y c oxidasas. Los codones de iniciación son ATG y ATT, además del tetracodón ATAA (Ashburner, 1989).

Secuenciación del genoma

Los proyectos para secuenciar genomas enteros de diversos organismos, tanto procariontes como eucariontes, se están llevando a cabo en muchos laboratorios alrededor del mundo. Su objetivo es el de conocer la organización molecular de la que se desprende una información detallada sobre los productos génicos que el genoma codifica. El catálogo completo de nucleótidos es la materia prima que permitirá, en pocos años, conocer con detalle los fenómenos biológicos fundamentales que subyacen en diferentes procesos celulares y del desarrollo, así como los aspectos relacionados con diversas enfermedades humanas.

Es en este contexto en el que *Drosophila* desempeña un papel muy importante, ya que es un organismo cuyo genoma ha sido mapeado tanto por recombinación meiótica como citológicamente, ha sido analizado genéticamente, se han aislado y caracterizado miles de mutantes cuyo fenotipo es accesible al nivel de las células. Mientras que muchas de la herramientas para el análisis funcional son específicas de *Drosophila*, como los cromosomas politénicos, los resultados de estos análisis tienen un valor intrínseco para la biología, debido a la universalidad de los procesos celulares y de desarrollo (Miklos y Rubin, 1996).

El recientemente secuenciado genoma de *Drosophila melanogaster* ha permitido, de entrada, establecer la estructura genómica de este organismo, así como algunos aspectos funcionales de la organización y composición del número completo de proteínas que codifica (proteoma) (Rubin y cols., 2000).

Se emplearon diversas estrategias para establecer la estructura genómica, entre ellas, la preparación de tres diferentes tipos de insertos de DNA clonado, con base en el tamaño de: 2 kb, 10 kb y 130 kb y la utilización de fragmentos de DNA cortados en segmentos de unos pocos miles de pares de bases y clonados en los vectores apropiados para la secuenciación. Después de ésta los fragmentos se ensamblaron, a partir de clones que se sobreponen, reconstruyéndose la secuencia genómica completa. Los resultados del análisis computacional, mediante la bioinformática, arrojaron una predicción de 13,601 genes; de ellos, más de 10,000 se revisaron manualmente en las bases de datos (Adams y cols., 2000).

La comparación entre los dominios proteicos, las redes intracelulares y las interacciones célula-célula en organismos ya secuenciados como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, y *Saccharomyces cerevisiae*, ha permitido establecer, en términos teóricos, relaciones evolutivas muy interesantes. Gran parte del genoma del gusano y de la mosca consiste en genes duplicados y estos genes parálogos se encuentran, la mayoría, dispersos en el genoma. Los que están agrupados (*clusters*) codifican para isoformas de la misma proteína. Cerca de 30% de los genes de *Drosophila melanogaster* se postula que tienen un ortólogo en el genoma de *Caenorhabditis elegans*. El tamaño de los proteomas en la mosca de la fruta y en el gusano es similar y sólo del doble del tamaño que se encuentra en la levadura unicelular *Saccharomyces cerevisiae* (tabla 25-1). Estos hechos han permitido postular que la complejidad de los metazoarios no depende del número de genes o de la generación de nuevos genes, sino más bien de las

El tamaño de los proteomas en la mosca de la fruta y en el gusano es similar y sólo del doble del tamaño que se encuentra en la levadura unicelular *Saccharomyces cerevisiae.*

Tabla 25-1. Tamaño del genoma y número estimado de genes en los genomas secuenciados de diversos organismos.

Organismo	Tamaño del genoma en Mb	Año en que se secuenció	Número estimado de genes
Haemophillus influenza	1.8	1995	1,740
Saccharomyces cerevisiae	12.1	1996	6,034
Caenorhabditis elegans	97	1998	19,099
Arabidopsis thaliana	100	2000	25,000
Drosophila melanogaster	180	2000	13,061
Homo sapiens	3,000	2001	35,000-45,000

nuevas combinaciones en los dominios de las proteínas o en las interacciones novedosas (Rubin y cols., 2000).



La toxicología genética

El ensayo de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo

Las investigaciones sobre la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (SLRLT) se iniciaron en 1927 cuando Muller empleó los rayos X para demostrar sus efectos mutágenicos en *Drosophila melanogaster*. Inicialmente empleó un cromosoma balanceado, ClB, que porta una inversión que impide la recombinación (C), uno letal (l) y un gen marcador que produce ojos en forma de barra (B). Los ensayos posteriores se realizaron con el cromosoma Basc que contiene múltiples inversiones, por lo que la supresión de los intercambios es superior a la que se presenta con el cromosoma ClB. El descubrimiento de la acción mutagénica del gas mostaza, en células somáticas (Auerbach, 1945), marca el inicio de las investigaciones para detectar el potencial mutágenico de una gran variedad de compuestos químicos. *Drosophila melanogaster* es el organismo de ensayo más frecuentemente empleado para detectar el riesgo genético que representa la exposición a diversos agentes químicos, en ocasiones extraordinariamente reactivos, con las diversas interacciones que se establecen con el DNA.

Las mutaciones letales recesivas ligadas al sexo se asume que resultan como consecuencia de mutaciones puntuales, deleciones pequeñas y aberraciones cromosómicas (figura 25-3). Estas últimas pueden observarse a nivel citológico en los letales inducidos tanto por radiaciones ionizantes como por agentes químicos. Las evidencias que demostraron la presencia de mutaciones puntuales en los letales inducidos, provinieron del análisis de los efectos provocados por algunos agentes alquilantes monofuncionales. La etilnitrosourea (ENU) y la dietilnitrosamina (DEN) no producen rompimientos cromosómicos en cepas proficientes en los mecanismos de reparación por

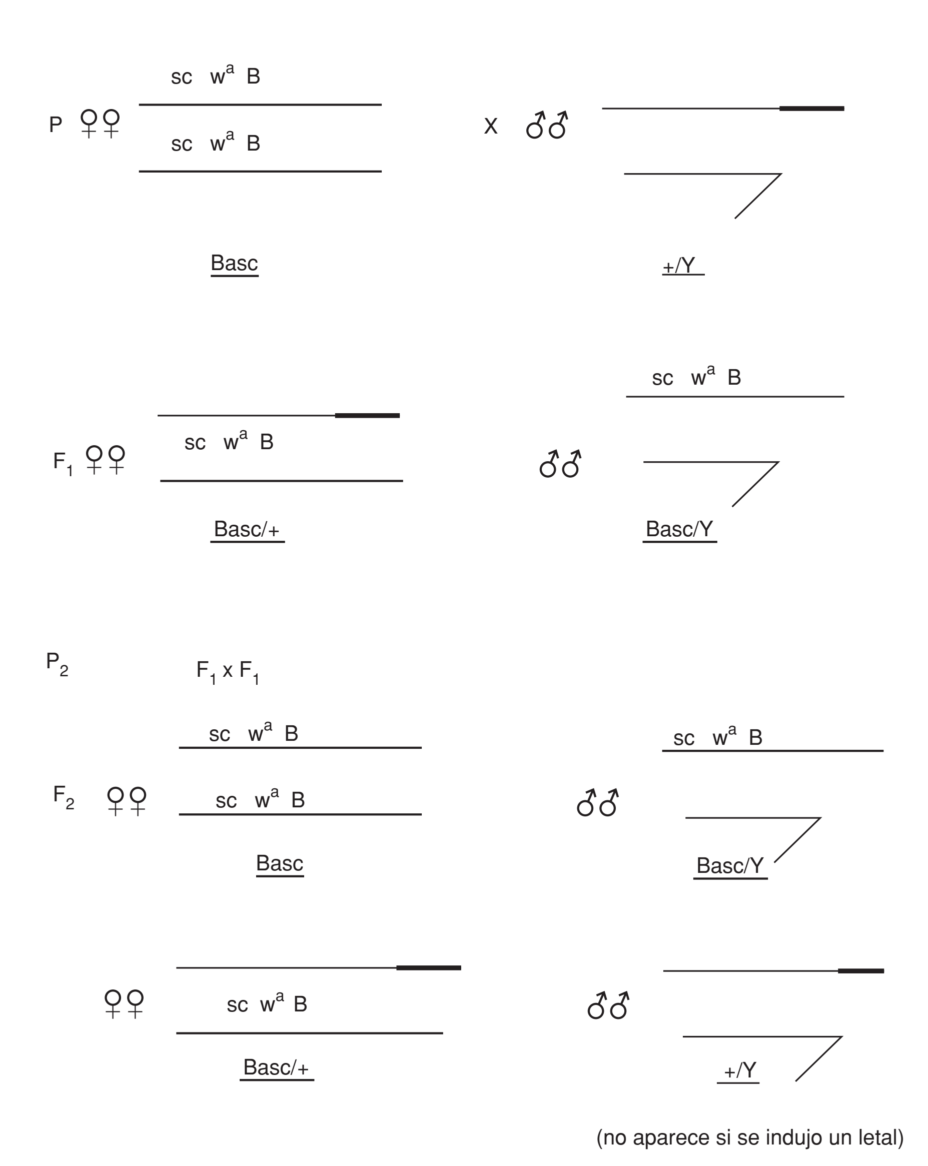


Figura 25-3. Ensayo de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo.

escisión, pero sí generan mutaciones letales en las mismas cepas. De otra parte, la mayoría de los letales inducidos por etilmetanosulfonato (EMS) se localizan en unidades de complementación que no se sobrelapan. El ensayo, por lo tanto, es capaz de detectar a los agentes químicos que producen mutaciones heredables, que van desde las mutaciones en una sola base nitrogenada del DNA hasta los efectos letales que se asocian con las aberraciones cromosómicas, y mide por ello el espectro completo de daño genético transmisible en las células germinales de un eucarionte intacto (Lee y cols., 1983).

La frecuencia espontánea de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en el genoma de *Drosophila* varía de cepa a cepa. Varias condiciones pueden afectarla: la movilización de transposones y los procesos de reparación del DNA. Las mutaciones espontáneas pueden tener un origen premeiótico y entonces se presentan agrupadas en la siguiente generación; el tamaño

La frecuencia espontánea de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en el genoma de *Drosophila* varía de cepa a cepa.

del agrupamiento (*cluster*) varía de 2 a 36. Las mutaciones letales recesivas ligadas al sexo que se producen de forma espontánea se presentan entre 0.08 y 0.3%, lo que corresponde a mutaciones específicas/locus de entre 0.1 y 0.3×10^{-5}, si se asume que en el cromosoma X existen 800 genes que pueden mutar hacia un letal recesivo (Woodruff y cols., 1984). No se han encontrado diferencias en cuanto a la frecuencia espontánea de letales entre los machos y las hembras.

La sensibilidad de los diversos estadios de la línea germinal es consistente para todos los agentes químicos de acción indirecta probados. El pico de actividad mutagénica se encuentra en las camadas que corresponden a las espermátidas y a los espermatocitos tardíos; las camadas correspondientes a las fases meiótica y premeiótica suelen mostrar una fertilidad reducida. Por lo que la bioactivación enzimática de los compuestos inertes se presenta en las células que muestran una mayor sensibilidad a la inducción de mutaciones. Con el ensayo de SLRLT se han podido probar cerca de 600 agentes químicos distintos, tanto de acción directa como promutágenos. La correlación entre la actividad carcinogénica y mutagénica del ensayo es excelente: entre 83 y 91% de los carcinógenos clásicos ensayados son mutágenos en *Drosophila* (Lee y cols., 1983; Vogel, 1987). Sin embargo, al calcular los parámetros de sensibilidad, especificidad y precisión, los datos muestran que los valores de sensibilidad y precisión son considerablemente bajos, si no se consideran en los cálculos a los agentes alquilantes (Rodríguez-Arnáiz, 1991a y b). De otra parte, el ensayo de SLRL no detecta a diversos promutágenos ubicuos en el ambiente como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las aminas aromáticas. Además, existe la posibilidad de que las células premeióticas que porten un letal se eliminen durante la meiosis, lo que genera una fuente de subestimación de los efectos inducidos.

La prueba cromosómica

La frecuencia espontánea de aberraciones cromosómicas en *Drosophila* es muy baja.

La frecuencia espontánea de aberraciones cromosómicas en *Drosophila* es muy baja, del orden de 1 en 10^3 a 10^4 translocaciones 2:3 (Valencia y cols., 1984). La frecuencia espontánea de pérdida total o parcial del cromosoma X es de 0.75 a 1% en los machos y de 0.13% en las hembras. El cromosoma X en anillo no se pierde en las células premeióticas (Woodruff y cols., 1984). La frecuencia de reversión es considerablemente baja, tanto para las mutaciones espontáneas como para las inducidas, a excepción de las mutaciones reversas que ocurren por la inserción de los elementos transponibles (Ashburner, 1989).

Las aberraciones cromosómicas y los procesos de pérdida total o parcial de cromosomas pueden agruparse con el nombre genérico de mutaciones cromosómicas.

Las aberraciones cromosómicas y los procesos de pérdida total o parcial de cromosomas pueden agruparse con el nombre genérico de mutaciones cromosómicas. De modo que las mutaciones cromosómicas son alteraciones que afectan la estructura de los cromosomas (translocaciones), el número de cromosomas (pérdida o ganancia: aneuploidía) y/o el contenido de los cromosomas (duplicaciones e inversiones). Las mutaciones cromosómicas resultan de procesos de rompimiento (clastogénesis) o por distorsiones

en la segregación de los cromosomas durante la meiosis. Los ensayos para valorar la inducción de mutaciones cromosómicas son complejos por el número de puntos genéticos terminales a evaluar y la variedad de esquemas genéticos que pueden diseñarse (figura 25-4). Así, se han construido los ensayos para valorar la inducción de translocaciones recíprocas 2:3, de pérdida total de los cromosomas sexuales y no disyunción (SCLT), empleando hembras proficientes en los mecanismos de reparación (P) y deficientes (mei-^{9a} D). Con estos ensayos se han evaluado alrededor de 200 agentes químicos.

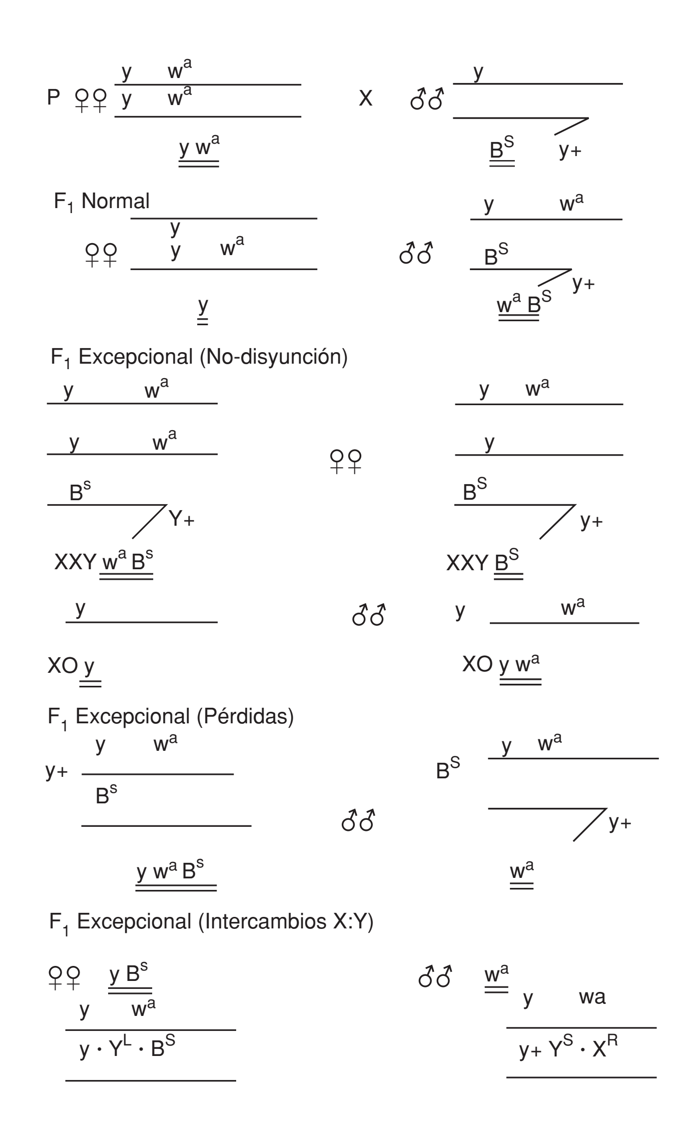


Figura 25-4. Prueba de mutaciones cromosómicas.

Los ensayos de mutación somática y recombinación mitótica

La recombinación mitótica fue descubierta en *Drosophila melanogaster* por Stern (1936), mientras que la inducción de intercambios mitóticos por

La recombinación mitótica fue descubierta en *Drosophila melanogaster* por Stern (1936).

rayos X ha sido empleada para estudiar el desarrollo de los discos imaginales en este organismo (García-Bellido, 1972). Los ensayos en los que se evalúa la inducción de mutaciones somáticas y recombinación mitótica (SMART) se basan en la generación de moscas con un genotipo tal que un proceso mutacional en la célula somática genera un cambio genético que se manifiesta fenotípicamente en todas las células hijas. Se emplean marcadores genéticos que afectan al genotipo de los discos imaginales, de modo que el daño se induce en las células de las larvas y se manifiesta en el cuerpo diferenciado del adulto. Los clones generan manchas en la superficie del adulto, por lo que permiten una detección sencilla del cambio genético producido. Las alteraciones genéticas pueden ser debidas a recombinación mitótica, mutación somática, rompimientos cromosómicos y no disyunción (Graf y cols., 1994).

Los ensayos de mutación somática y recombinación mitótica más utilizados son los que emplean marcadores genéticos en las alas y en los ojos. En el ensayo de las alas, se trata a las larvas transheterocigotas para los marcadores *mwh* y *flr;* en esta configuración, la recombinación somática entre el centrómero y *flr* genera una mancha gemela que consiste en dos clones adyacentes de células que muestran tricomas *flr* y *mwh*; la recombinación somática entre los dos marcadores, así como la deleción o mutación, generan el mismo tipo de clon (Graf y cols., 1994) véase figura 25-5. De modo que

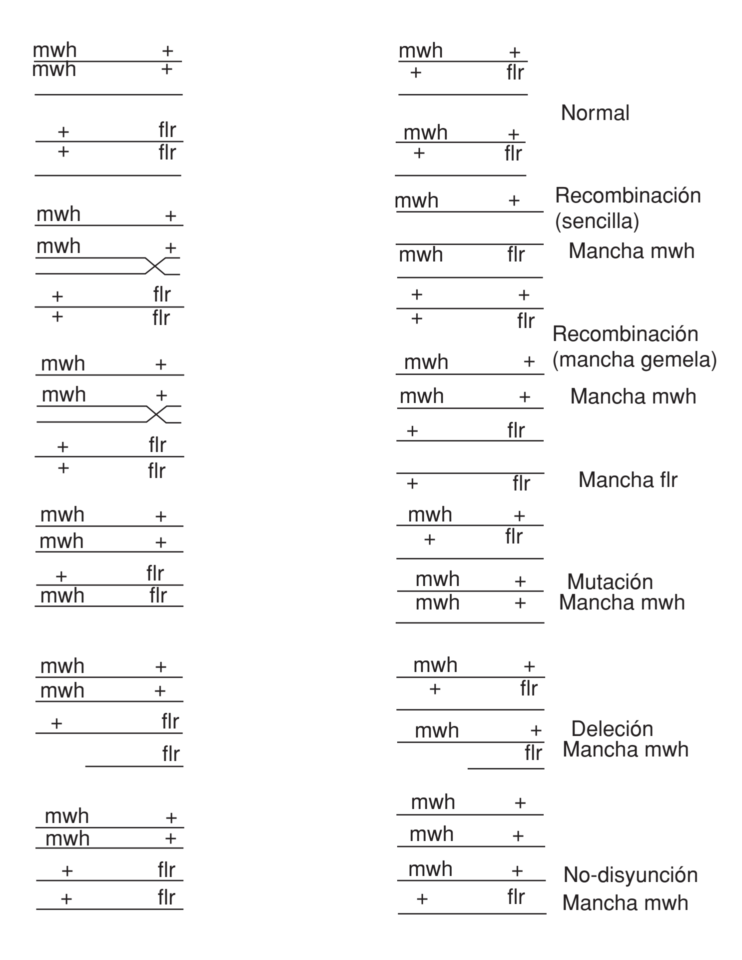
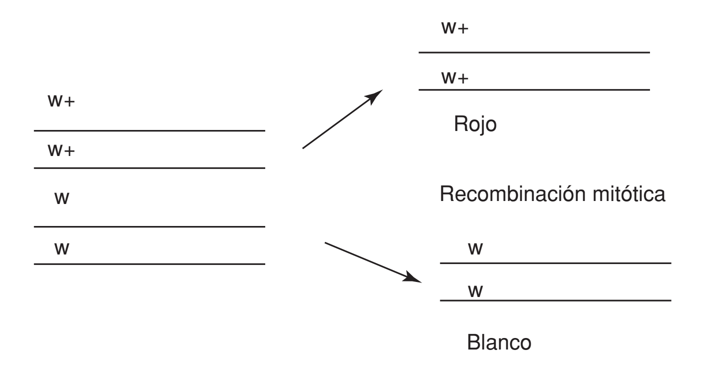


Figura 25-5. Eventos genéticos que pueden producirse en las células somáticas y que se recobran como manchas en el ensayo *mwh/fr*.



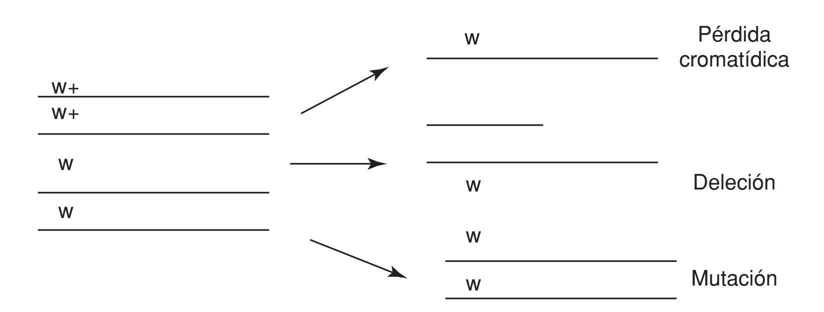


Figura 25-6. Eventos genéticos que pueden producirse en las células somáticas y que se recobran como manchas en el ensayo w/w+.

sólo es posible determinar con certeza los procesos recombinogénicos inducidos cuando se analizan y comparan las alas transheterocigotas y las alas portadoras del balanceador en las que todos los procesos de recombinación se eliminan debido a las múltiples inversiones que porta el cromosoma TM3 (Graf y cols., 1989; Rodríguez-Arnáiz y cols., 1996). En el ensayo somático de los ojos, si bien es posible que las manchas se originen por recombinación mitótica, pérdida cromatídica, deleción y/o mutación puntual (figura 25-6), desde el punto de vista cuantitativo la recombinación mitótica es el suceso principal que produce los clones (Vogel y Szakmary, 1991). Por otra parte, la pérdida de la heterocigosis en células somáticas, debida a la recombinogénesis, se ha asociado, al menos en parte, con los fenómenos de iniciación de algunos tipos de cáncer. En ambos ensayos se han analizado los efectos genotóxicos de 150 carcinógenos con mecanismos de acción variados: unión covalente al DNA, inhibidores de la replicación, venenos mitóticos y agentes intercalantes, entre otros. Los parámetros de sensibilidad y precisión muestran ser altamente satisfactorios (Rodríguez-Arnáiz, 1991b).

La variabilidad genética con respecto al metabolismo de xenobióticos es un fenómeno bien conocido en *Drosophila*. Como consecuencia de ello, la inducción de daño genético por genotoxinas que requieren ser biotransformadas muestra ser dependiente del genotipo en esta especie. Los ensayos SMART aumentan su capacidad de detección cuando se emplean cepas de

La variabilidad genética con respecto al metabolismo de xenobióticos es un fenómeno bien conocido en *Drosophila*.

alta bioactivación (Frölich y Würgler, 1989) que son resistentes a pesticidas (Vogel y cols., 1991). Se encontraron variaciones hasta de 20 veces en la respuesta en las cepas resistentes a pesticidas (IR), con respecto a las cepas susceptibles a pesticidas (IS), en la activación de diversos promutágenos; la biotransformación de estas progenotoxinas involucra el metabolismo oxidativo mediado por los citocromos p450 (Rodríguez-Arnáiz y cols., 1993).

Los citocromos p450

Diversidad de los citocromos: estructura y funciones

Los citocromos p450 conforman una superfamilia de hemoproteínas que se caracterizan porque tienen una secuencia de aminoácidos muy conservada.

Los citocromos p450 conforman una superfamilia de hemoproteínas que se caracterizan porque tienen una secuencia de aminoácidos muy conservada —el decapéptido de unión al grupo hemo FXXGXXXCXG— y por mostrar un pico en el espectro de absorbancia a los 450 nm. La diversidad de los citocromos p450 está muy bien establecida en términos tanto de las reacciones que catalizan, como de la diversidad de sustratos sobre los cuales actúan. Las funciones que se llevan a cabo en el metabolismo incluyen la oxidación, la peroxidación y la reducción de esteroides, ácidos grasos, postaglandinas, aminas biogénicas, feromonas y productos secundarios de plantas. Estas enzimas también se requieren para la supervivencia de los organismos en medios que les son particularmente adversos, ya que contribuyen a la inactivación de muchos compuestos tóxicos. Un efecto dual en metabolismo de los compuestos xenobióticos es la activación de diversos promutágenos, como drogas y agentes ubicuos en el ambiente, hacia un compuesto genotóxico. Las enzimas P450 están presentes en la fase I del metabolismo, en la que se oxigena un sustrato; la fase II del metabolismo emplea al oxígeno como el sitio a conjugar, reacción que es mediada por glutatión, glucorinización o por glicina. Ambas fases del metabolismo son necesarias para la desintoxicación.

Los citocromos p450 desempeñan un papel muy importante en los procesos de mutagénesis y carcinogénesis.

Los citocromos p450 desempeñan, por tanto, un papel muy importante en los procesos de mutagénesis y carcinogénesis, ya que la iniciación de éstos depende en gran medida de la biotransformación de compuestos inertes a metabolitos electrofílicos reactivos, los que pueden interaccionar en forma covalente con el DNA. Los aductos así formados pueden ser reparados en forma eficiente, o bien, el proceso mismo de la reparación puede promover errores en la secuencia de los nucleótidos, generándose una mutación estable que se transmite a la siguiente generación.

La superfamilia de los citocromos p450 es muy antigua; el gen ancestral se piensa que existió desde hace 2,500 millones de años, en un tiempo en el que obviamente no existían las drogas, los productos orgánicos de combustión, ni mucho menos las interacciones planta-animal. De modo que estas enzimas han desempeñado un papel esencial en el mantenimiento del nivel estable de los ligandos endógenos, que están involucrados en la modulación de procesos como la homeostasis, el crecimiento, la diferenciación y las funciones neuroendocrinas (Nebert, 1991).

La superfamilia de los citocromos p450 consta de alrededor de 481 genes agrupados en 74 familias diferentes (Nelson y cols., 1993). Aparentemente la regla es que cada gen de los citocromos p450 codifique para una proteína particular, sin embargo, existen algunas excepciones en las que pueden ocurrir empalmes alternativos, es decir, el procesamiento diferencial de los transcritos P450 de manera tal que los exones o partes de los exones traducidos son intercambiados para producir una enzima con una nueva actividad catalítica, que se expresa en un tejido específico. En el genoma de los mamíferos se han detectado más de 50 familias de estas enzimas (Nelson y cols., 1993).

Los citocromos p450 en los insectos

En los insectos, los citocromos p450 están involucrados en el crecimiento y en el desarrollo a través del procesamiento de ácidos grasos, hormonas y feromonas; catalizan también un amplio rango de reacciones enzimáticas de una gran diversidad de compuestos exógenos, tales como la biotransformación de productos secundarios de plantas y de productos químicos sintéticos como los insecticidas (Feyereisen, 1993). Los citocromos p450 se expresan en las larvas en el tubo digestivo y en los cuerpos grasos y, además, en el aparato reproductivo y en los tubos de Malpighi en los adultos.

> En los insectos, los citocromos p450 están involucrados en el crecimiento y en el desarrollo.

En los insectos se han identificado diversas secuencias que codifican para los citocromos p450. Los genes P450 pertenecen a 25 familias, cinco de las cuales están presentes en lepidópteros, coleópteros, himenópteros, ortópteros e isópteros. Las isoformas de la familia CYP6 son específicas de los insectos, mientras que las de la familia CYP4 presentan homología con secuencias de vertebrados. Se han identificado por bioinformática 90 genes de la superfamilia de los citocromos p450 en el genoma de *Drosophila melanogaster*. De éstos, 83 secuencias codifican para un producto funcional y siete aparentemente son pseudogenes. Más de la mitad de los genes pertenecen a las familias 4 y 6; existen además ocho genes que codifican para citocromos p450 mitocondriales. Las 90 secuencias se encuentran en los cromosomas 1 (X), 2 y 3; los cromosomas Y y 4 no poseen secuencias de la superfamilia; además, el cromosoma 2 contiene más de la mitad de los genes P450. Todos los genes, menos cinco, están organizados en secuencias que contienen exones e intrones (Tijet y cols., 2001).

Se han asignado diversas funciones a las proteínas P450: CYP4C1 en el catabolismo de lípidos; CYP6B1 en la degradación de productos secundarios de plantas; CYP6A2, CYP6D1 en el metabolismo de insecticidas y compuestos exobióticos; CYP18 en el metabolismo de ecdiesteroides y CYP28 en la desintoxicación de productos secundarios de plantas (Waters y cols., 1992; Gandhi y cols., 1992; Frolov y Alatortsev, 1994; Snyder y cols., 1995; Dunkov y cols., 1996; Bassett y cols., 1997; Danielson y cols., 1997). Sin embargo, solamente el producto del gen CYP6A2 ha sido caracterizado desde el punto de vista funcional (Saner y cols., 1996) (tabla 2).

Tabla 25-2. Los citocromos p450 de *Drosophila melanogaster.*

Gen	Número de secuencias	Función
CYP4	10	Catabolismo de lípidos
CYP6	3	Resistencia a pesticidas y metabolismo de xenobióticos
CYP9	3	Resistencia a pesticidas
CYP18	1	Metabolismo de ecdiesteroides
CYP28	2	Desintoxicación de aleloquímicos
CYP oxidoreductasa	1	Transferencia de electrones de NADPH a los citocromos p450

En *Drosophila* ha sido posible además aislar cDNA y clones genómicos que codifican para la citocromo P450-NADPH-reductasa, enzima que cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH hasta los citocromos. La oxidorreductasa es una flavoproteína que se encuentra anclada en el retículo endoplásmico y en la membrana nuclear. El gen contiene seis exones y su secuencia es casi idéntica a la del gen que se encuentra en la mosca doméstica. La secuencia de esta proteína está evolutivamente muy conservada, ya que es muy parecida en organismos tan distantes como la levadura, la mosca y los vertebrados (Hovemann y cols., 1997).

Drosophila es por ello un excelente modelo para analizar las funciones de los citocromos p450, en relación al metabolismo endógeno y exógeno, en la resistencia a pesticidas y a la coevolución entre animales herbívoros y plantas fanerógamas.

Sustratos: endógeno y exógeno

El citocromo CYP6A2 de *Drosophila melanogaster* se expresa de manera diferencial durante el desarrollo, encontrándose un pico de actividad en las larvas de tercer estadio; así mismo, aunque su localización es ubicua en las larvas, se expresa preferentemente en los cuerpos grasos. Su secuencia muestra un intrón de 60 pb en la misma posición en la que se encuentra en el gen CYP6A1 de la mosca doméstica, hechos que hacen pensar que ambos dípteros comparten un gen ancestral CYP6A. Aunque el mRNA de CYP6A2 se encontró en cepas resistentes y susceptibles a pesticidas, en las primeras los niveles fueron considerablemente más altos, por lo que la resistencia a pesticidas debe de estar relacionada con la expresión elevada de este gen. En experimentos en los cuales se logró coexpresar al cDNA CYP6A2 de *Drosophila* con el cDNA de la citocromo NADPH-oxidorreductasa humana en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se encontró que el cultivo transformado activó a la aflatoxina B1 hacia un producto que indujo conversión genética (Saner y cols., 1996).

La expresión de algunos citocromos p450 puede incrementarse con pretratamientos con inductores como el fenobarbital. El gen CYP6A2 es inducible en cepas susceptibles hasta por un factor de 15; el gen se transcribe en adultos en el intestino medio, los cuerpos grasos pericuticulares y los tubos de Malphigi. Esta localización en la expresión está relacionada con las

vías de contacto de la mosca con los xenobióticos: cuando ingresan al organismo, se exponen el intestino medio y los cuerpos grasos pericuticulares, mientras que cuando son excretados se exponen los tubos de Malphigi. En cepas resistentes a pesticidas, el barbitúrico no es tan efectivo en la inducción (factor 2.5). Los mecanismos de inducción parecen ser muy complejos; se asume que están involucrados tanto activadores de la transcripción como otras proteínas (Brun y cols., 1996).



La resistencia a pesticidas

Los seres vivos muestran una extraordinaria capacidad para desarrollar resistencia frente a las toxinas ambientales. El empleo de compuestos químicos sintéticos para controlar, en especial durante los últimos 50 años, a organismos no deseados ha puesto en evidencia el fenómeno de resistencia. Ésta es la capacidad que tiene un ser vivo de sobrevivir a dosis de toxinas que son letales para sus congéneres susceptibles. Entre los insectos, la resistencia a toxinas puede ser transitoria, fenómeno conocido como tolerancia, ya que cesa cuando el organismo no está expuesto a la toxina en cuestión y resulta de la inducción de las enzimas capaces de degradar al xenobiótico. La resistencia puede ser permanente cuando ésta persiste aun después de que la población no esté expuesta al insecticida y es consecuencia de la sobreexpresión constitutiva de las enzimas P450.

> Los seres vivos muestran una extraordinaria capacidad para desarrollar resistencia frente a las toxinas ambientales.

La resistencia a pesticidas, además del aspecto aplicado, es un magnífico modelo para estudiar las bases moleculares del cambio evolutivo, en particular, la adquisición cualitativa de fenotipos diferentes. Tiene también la ventaja en la biología evolutiva de que el cambio ha sido muy rápido, se ha extendido lo suficiente y por ello puede analizarse con detalle. Alrededor de 450 especies de insectos y ácaros han desarrollado resistencia a pesticidas en los últimos 40 años.

> La resistencia a pesticidas, además del aspecto aplicado, es un magnífico modelo para estudiar las bases moleculares del cambio evolutivo.

Existen cinco clases químicas de pesticidas: 1) organofosforados, como el diazenón y el paratión; 2) carbamatos (carbaril y aldicarb); 3) organoclorados (DDT, metoxicloro); 4) ciclodienos (heptacloro y dieldrín), y 5) piretroides (permetrín y fenavalerato). Los cinco afectan de alguna manera al sistema nervioso; así, los organofosforados y los carbamatos afectan al metabolismo del neurotransmisor acetilcolina; los ciclodienos afectan al proceso de sinapsis, mientras que el DDT y los piretroides afectan a los canales de sodio de las membranas de las células nerviosas.

> Existen cinco clases químicas de pesticidas.

Se han identificado muchos mecanismos de resistencia a insecticidas; éstos varían de acuerdo al insecticida en cuestión, la especie de insecto y a veces entre las poblaciones de la misma especie. Muchos mecanismos confieren resistencia a todas las clases químicas de insecticidas y muchos otros confieren resistencia cruzada a miembros de otras clases.

La resistencia a pesticidas involucra un número finito de reacciones bioquímicas y de opciones genéticas; cada una de ellas puede servir de modelo para el estudio del cambio evolutivo. La aclaración de cualquier modelo a nivel molecular requiere primero del conocimiento detallado de la resistencia a nivel genético y bioquímico, así como de la población particular

> La resistencia a pesticidas involucra un número finito de reacciones bioquímicas y de opciones genéticas.

de insectos a la que afecta. Se han encontrado tres tipos de adaptaciones bioquímicas que confieren la resistencia a pesticidas: 1) decremento en la absorción; 2) modificación del sitio blanco, y 3) aumento en los mecanismos de desintoxicación.

1. *El decremento en la absorción y en la penetración del insecticida* es, generalmente, de importancia secundaria con respecto a otros mecanismos que confieren resistencia. Los genes que controlan la penetración reducida, como el *pen* que se encuentra en el cromosoma 3 de la mosca doméstica, confieren un nivel bajo de resistencia, ya que sólo retardan la penetración del insecticida.
2. *Modificación del sitio blanco*. Las alteraciones en la sensibilidad de las moléculas blanco de los insecticidas pueden conferir altos niveles de resistencia. El insecticida, una vez que ha ingresado al organismo, interactúa con las moléculas blanco, usualmente proteínas, alterando su función. La molécula blanco de los piretroides y del DDT son los canales de sodio de las membranas nerviosas. Esta molécula blanco consiste en una proteína transmembranal que contiene cuatro dominios parecidos. Una mutación puntual que genera el cambio de un solo aminoácido (M por T) en el dominio II de la proteína, produce el fenotipo de resistencia por derribo (*knock-down resistance, kdr),* mutación que impide que los piretroides se unan al poro del canal de sodio. La resistencia por modificación del sitio blanco se debe, pues, a cambios sutiles en la proteína, mutaciones puntuales, que alteran a la proteína blanco modificando su actividad biológica.
3. *El aumento en los mecanismos de desintoxicación* es el mecanismo de resistencia más importante del reino animal. Está mediado por los citocromos p450 (en la fase I del metabolismo) o por las glutatión-S-transferasas (GST) (en la fase II del metabolismo). La resistencia metabólica a insecticidas se debe principalmente a cambios en los mecanismos de expresión genética, ya sea un aumento en la transcripción del gen que confiere resistencia o por el incremento en el número de copias génicas. La sobreexpresión genética es el mecanismo más importante de resistencia en *Drosophila*; es un mecanismo que se presenta tanto en los genes que codifican para los citocromos p450 como en los que codifican para las GST. La amplificación génica ha sido descrita en algunos mosquitos y áfidos, pero no en *Drosophila*.

Hace pocos años fue posible clonar, localizar por hibridación *in situ* en los cromosomas politénicos y descubrir nueve genes agrupados que codifican para enzimas P450 que pertenecen a las familias CYP4, CYP6 y CYP9 en la mosca de la fruta. Estos genes se encuentran en 10 agrupamientos (*clusters*); se cree que éstos se originaron por duplicaciones génicas y procesos de conversión genética seguidos de divergencia evolutiva. Esta hipótesis se apoya en el análisis filogénico de las secuencias P450 de los dípteros; así, algunos grupos de genes como los de la subfamilia CYP4D divergieron pron-

to, ya que se encuentran representantes de ella en *Drosophila melanogaster, Musca domestica y Anopheles albimatus*; es más, han permanecido agrupadas en 2D-2E (bandas 42-45). Mientras que la subfamilia CYP4C también está representada en la mosca de la fruta, la mosca doméstica y el mosquito, los genes de la subfamilia CYP4E sólo se encuentran en el genoma de *Drosophila melanogaster* (Dunkov y cols., 1996).

La resistencia a insecticidas organofosforados en *Drosophila melanogaster* se ha asociado a cuatro genes localizados tanto en el cromosoma 2 como en el 3. Uno de ellos se localiza en el cromosoma 2 en posición 64.5 (Hällstrom, 1985); se encuentra en muchas poblaciones y parece ser que está involucrado en la resistencia metabólica mediada por P450. Es probable que este gen codifique para una molécula represora en *trans* de uno o varios P450, ya que se ha mostrado que en las cepas susceptibles a pesticidas (IS) la expresión normal de los P450 está reprimida, mientras que en las resistentes (IR) la sobreexpresión constitutiva puede ser el resultado de que posean un represor no funcional.

La resistencia a insecticidas organofosforados en *Drosophila melanogaster* se ha asociado a cuatro genes localizados tanto en el cromosoma 2 como en el 3.

En el genoma de *Drosophila melanogaster* existen 42 genes que codifican para las GST; estas enzimas son tan complejas y versátiles como las P450. Las glutatión-S-transferasas están también involucradas en la desintoxicación de los insecticidas organofosforados y quizás también del DDT. En *Heliothis virescens* y en la mosca doméstica se han identificado tres diferentes transferasas en distintas cepas. No se sabe si estos genes se encuentran en el mismo *locus*; sin embargo, una de ellas se ha mapeado en el cromosoma 2 de la mosca doméstica. En este mismo cromosoma se ha mapeado un gen que controla la actividad de la DDT-dehidroclorinasa, una transferasa que degrada al DDT y a sus análogos en productos no tóxicos y desempeña, por tanto, un papel importante en la resistencia al DDT en estos insectos. Se ha postulado que el gen codifica para un receptor citoplásmico, que puede ser el receptor de la hormona juvenil, que reconoce y se pega a los insecticidas. Como evidencia que apoya a esta hipótesis se cita que las oxidasas de función mixta, las glutatión-S-transferasas y la DDT-dehidroclorinasa se inducen de forma coordinada (Plapp, 1984). En *Drosophila melanogaster* este gen, GST D1, muestra tener actividad de DDT-dehidroclorinasa, ya que se sobreexpresa en cepas resistentes a DDT (Tang y Tu, 1994).

Coevolución

La batalla que se ha venido desarrollando entre las plantas y los animales herbívoros ha generado una adaptación de los segundos a los productos tóxicos secundarios producidos por las primeras. Los patrones de interrelación insecto-planta entre diversas especies de *Drosophila* y los cactus columnares del desierto de Sonora, están muy bien documentados y constituyen un modelo para investigar el papel que desempeñan los citocromos p450 en la resistencia a los compuestos químicos secundarios —alcaloides— que producen las plantas.

Cuatro especies de *Drosophila*: *mettleri, nigrospiracula, mojavensis* y *pachea,* emplean para su alimentación y crianza los tejidos necróticos de

cinco especies de cactus: el saguaro (*Carnegiea gigantea*), el *cardón (Pachycereus pronglei*), la senita (*Lophocereus schotti*), el agria (*Stenocereus gummosus*) y el órgano (*Stenecereus thurberi*). Además de la diferencia que existe en la distribución geográfica del huésped como del parásito, existe una relación uno a uno entre cada especie de insecto y la especie de cactus que utiliza como alimento. Las especies de *Drosophila* son endémicas del desierto de Sonora y no están relacionadas filogenéticamente. Cada especie de cactus produce alcaloides específicos que son tóxicos para casi todas las especies residentes en ese nicho. De modo que el empleo exitoso de los tejidos del cactus requiere de la capacidad de los insectos para tolerar las toxinas; el metabolismo de los alcaloides que producen los cactus está mediado por los citocromos de la familia 28, que son inducibles. La relación entre estos cactus columnares y los mecanismos enzimáticos de desintoxicación desarrollados por los insectos que se alimentan de ellos es un ejemplo documentado de coevolución (Fogleman, 2000).

Adecuación de los insectos resistentes

Un problema central en la evolución de la resistencia es la adecuación de un organismo que porta un alelo mutante que le confiere resistencia. La adecuación se refiere a la supervivencia y capacidad reproductiva de un organismo; puede estudiarse midiendo la mortalidad durante el desarrollo, la fertilidad de uno o ambos sexos y la longevidad.

La adecuación relativa de un organismo puede analizarse midiendo la capacidad de una cepa resistente para competir con una cepa susceptible, colocando a ambas cepas en cajas de población en el laboratorio. El metopreno es un compuesto químico que actúa como insecticida agonista de la hormona juvenil, por lo que la exposición a este agente químico distorsiona la metamorfosis de muchos insectos, inclusive de *Drosophila melanogaster* (Wilson y Fabian, 1986). En poblaciones silvestres de este organismo no se han identificado cepas resistentes al insecticida, pero, en el laboratorio, ha sido posible inducir mutaciones, generándose una cepa mutante *Met* que es resistente al agonista de la hormona juvenil. Al clonar *Met* se encontró que pertenece a una familia de reguladores transcripcionales; es más el alelo nulo de *Met*, Met^{22}, representa un raro ejemplo de resistencia debida a la ausencia de un producto génico en el sitio blanco (Restifo y Wilson, 1998). Al comparar diversos parámetros entre mutantes homocigotos para *Met* con cepas silvestres, se encontró que muchos eran similares, excepto por un retraso de un día en la ovogénesis en las cepas homocigotas; como consecuencia de ello, el alelo *Met* cayó a niveles muy bajos en pocas generaciones, lo que demuestra que las moscas *Met* no son capaces de competir en ausencia del insecticida probablemente debido a un retraso en la ovogénesis (Minkoff y Wilson, 1992).

El estudio de la adecuación es entonces importante para poder entender la evolución de la resistencia. Un alelo que produzca en condición homocigota un fenotipo importante podrá persistir en la condición heterocigota, ya que el organismo será parcialmente resistente, tendrá una ventaja sobre los

susceptibles cuando el insecticida esté presente en el medio en cantidades bajas. Éste puede ser el mecanismo mediante el cual los alelos que confieren resistencia persistan en las poblaciones aun cuando no se sometan a la presión de selección de un insecticida. Otro hecho interesante es el que muestra que los alelos que confieren resistencia restringen también la adecuación, lo que podría explicar, al menos en parte, los pocos sitios blanco que se ven afectados por los alelos de resistencia en las poblaciones resistentes. Podría pensarse que en los organismos sólo se permiten pocos cambios en los aminoácidos que afecten tanto a la resistencia como a la adecuación, ya que estos parámetros son los únicos que sobreviven por selección. O bien, podría pensarse que sólo ocurren muy pocas mutaciones puntuales en los genes que confieren resistencia en las poblaciones naturales y, si una mutación afectara tanto a la resistencia como a la adecuación, podría provocar la rápida desaparición de la población por la presión de selección (Wilson, 2001).



Referencias bibliográficas

Adams, M.D.; Celniker, S.E.; Holt, R.A. y cols., "The genome sequence of *Drosophila melanogaster", Science,* **287:** 2185-2195, 2000.

Arkhipova, I., "Promoter elements in *Drosophila melanogaster* revealed by sequence analysis", *Genetics,* **139:** 1359-1369, 1995.

Ashburner, M., *Drosophila a laboratory handbook*, Cold Spring Harbor Lab. Press., EE.UU., 1331, 1989.

Artavanis-Tsakonas, S.; Matsumoto, K. y Fortini, M.E., "Notch signaling", *Science,* **268:** 225-232, 1985.

Auerbach, C., "The problem of chromosome rearrangements in somatic cells of *Drosophila", Proc. Roy. Soc.,* Edimburgo, **B62:** 120-127, 1945.

Banfi, S.; Borsani, G.; Bulfone, A. y Bellabio, A., "*Drosophila*-related expressed sequences", *Hum. Mol. Genet.,* **6:** 1745-1753, 1997.

Bassett, M.H.; McCarthy, J.L.; Waterman, M.R. y Sliter, T.J., "Sequence and developmental expression of Cyp18, a member of a new cytochrome P450 family from *Drosophila*", *Mol. Cel. Endocrinol.,* **131:** 39, 1997.

Berg, D.E. y Howe, M.M., "Mobile DNA", DC, *Am. Soc. Microbiol.,* Washington, 1989.

Bridges, C.B., "Salivary chromosome maps, with key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*", *J. Hered.,* **26:** 60-64, 1935.

Brousseau, G.E., "Genetic analysis of the male fertility factors on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster", Genetics,* **45:** 257-274, 1960.

Brun, A.; Cuany, A.; Le Mouel, T.; Berge y Amichot, M., "Inducibility of the *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 gene CYP6A2 by phenobarbital in insecticide susceptible resistant strains", *Insect Biochem. Mol. Biol.,* **26:** 697-703, 1996.

Clark, R.F. y Elgin, S.C., "Heterochromatin protein 1, a known supressor of position-effect variegation", *Chromosoma,* **102:** 583-590, 1992.

Crain, W.R.; Eden, F.C.; Pearson, W.R.; Davidson, E.H. y Briten, R.J., "Absence of short period interspersion of repetitive and nonrepetitive sequences in the DNA of *Drosophila melanogaster*", *Chromosoma,* **56:** 309-326, 1976.

Danielson, P.B.; MacIntyre, R.G. y Fogelman, J.C., "Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome P450s: evidence for involvment in host-plant allelochemical resistance", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **94:** 10797-10802, 1997.

Dunkov, B.C.; Rodríguez-Arnáiz, R.; Pittendrigh, B.; ffrench-Constant, R.H. y Feyeresien, R., "Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster", Mol. Gen. Genet,* **251:** 290-297, 1996.

Feyereisen, R., "Cytochrome P450 in insects", en *Cytochrome P450,* Schenkman, J.B. y Greim, H., eds., Springer-Verlag, Heidelberg, 311-324, 1993.

Fogleman, J.C., "Response *of Drosophila melanogaster* to selection for P450-mediated resistance to isoquinoline alkaloids", *Che. Biol. Interact.,* **125:** 93-105, 2000.

Fortini, M.E. y Rubin, G.M., "Analysis of cis-acting requirements of the Rh3 genes reveals a bipartite organization to rhodopsin promoters in *Drosophila melanogaster", Genes Dev.,* **4:** 444-463, 1990.

Frölich, A. y Würgler, F.E., "New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test", *Mutat. Res.,* **216:** 179-187, 1989.

Frolov, M.V. y Alatortsev, V.E., "Cluster of cytochrome P450 genes on the X chromosome of *Drosophila melanogaster*", *DNA Cell Biol.,* **13:** 663-668, 1994.

Gandhi, R.; Varak, E. y Goldberg, M.L., "Molecular analysis of a cytochrome P450 gene of family 4 on the X chromosome", *DNA Cell Biol.,* **11:** 397-404, 1992.

García-Bellido, A., "Some parameters of mitotic recombination in *Drosophila melanogaster", Mol. Gen. Genet.,* **115:** 54-72, 1972.

——— y Dapena, J., "Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*", *Mol. Gen. Genet.,* **128:** 117-130, 1974.

——— y Merriam, J.R., "Cell lineage of the wing imaginal disc in *Drosophila melanogaster", J. Exp. Zool.,* **170:** 61-76, 1969.

Graf, U.; Frei, H.; Kägi, A.; Katz, A.J. y Würgler, F.E., "Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing test", *Mutation Res.,* **222:** 359-373, 1989.

——— ; Würgler, F.E.; Katz, A.J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall C.B. y Kale, P.G., "Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*", *Environ. Mutag.,* **6:** 153-188, 1994.

Hällstrom, I., "Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster* II. Localization of some genes regulating cytochromes P-450 activity", *Chem. Biol. Interact.,* **56:** 172-184, 1985.

Heitz, E., "Das Heterochromatin der Moose", *Jahrbsenschaft Bot.,* **69:** 762, 1928.

Hovemann, B.T.; Sehlmeyer, F. y Malz, J., "*Drosophila melanogaster* NADPH_cytochrome P450 oxidoreductase: pronounced expression in antennae may be related to odorant clearance", *Gene,* **189:** 213-219, 1997.

John, B. y Miklos, G.L., "The eukaryote genome", en *Development and evolution,* Allen and Unwin, Londres, 1988.

Kim, A.; Terzian, C.; Santamaria, P.; Pelisson, A.; Prud'Homme, N. y Bucheton, A., "Retroviruses in invertebrates: The *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **91:** 1285-1289, 1994.

Lee, W.R.; Abrahamson, S.; Valencia, R.; Von Halle, E.S.; Würgler, F.E. y Zimmering, S., "The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*", *Mutat. Res.,* **123:** 183-279, 1983.

Lindsley, D.L. y Zimm, G., "The genome of *Drosophila melanogaster"*, Academic Press, San Diego, CA, 1133, 1992.

Lowenhaupt, K.; Rich, A. y Pardue, M.L., "Nonrandom distribution of long mono- and dinucleotide repeats on *Drosophila* chromosomes: correlations with dosage compensation, heterochromatin, and recombination", *Mol. Cell Biol.,* **9:** 1173-1182, 1989.

Merriam, J.; Ashburner, M.; Hartl, D.L. y Kafatos, F.C., "Toward cloning and mapping the genome of *Drosophila*", *Science,* **254:** 221-225, 1991.

Miklos, G.L., "Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes", en *Molecular evolutionary genetics,* MacIntyre, R.J., ed., Plenum Press, Nueva York, 241-321, 1985.

——— y Rubin, G.M., "The role of Genome Project in determining gene function: insights from model organisms", *Cell,* **86:** 521-529, 1996.

Minkoff, C. III y Wilson, T.G., "The competitive ability and fitness components of the methoprene-tolerant (Met) *Drosophila* mutant resistant to juvenile hormone analog insecticides", *Genetics,* **131:** 91-97, 1992.

Muller, H.J., "Artificial transmutation of the gene", *Science,* **66:** 84-87, 1927.

Nebert, D.W., "Proposed role of drug-metabolizing enzimes: Regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation and neuroendocrine functions", *Mol. Endocrinol.,* **5:** 1203-1314, 1991.

Nelson, D.R.; Kamataki, T.; Waxman, D.J.; Guengerich, F.P.; Estabrook, R.W.; Feyereisen, R.; Gonzalez, F.J.; Coon, M.J.; Gunsalus, I.C.; Gotoh, O.; Okuda, K. y Nebert, D.W., "The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature", *DNA Cell Biol.,* **12:** 1-51, 1993.

Nusslein-Volhard, C., "Of flies and fishes", *Science,* **266:** 572-574, 1994.

Pardue, M.L.; Danielevskaya, O.N.; Lowenhaupt, K.Y.; Slot, F. y Traverse, K.L., "*Drosophila* telomers: new views on chromosome evolution", *TIG,* **12:** 48-52, 1996.

Penotti, F., "Human DNA TATA boxes and transcription initiation sites: a statistical study", *J. Mol. Biol.,* **213:** 37-52, 1990.

Plapp, F.W., "The genetic basis of insecticide resistance in the house fly: Evidence that a single locus plays a major role in metabolic resistance to insecticides", *Pest. Biochem. Physiol.,* **22:** 194-201, 1984.

Rasch, E.M.; Barr, H.J. y Rasch, R.W., "The DNA content of sperm of *Drosophila melanogaster*", *Chromosoma,* **33:** 1-8, 1971.

Restifo, L.L. y Wilson, Y.G., "A juvenile hormone agonist reveals distinct developmental pathways mediated by ecdysone-inducible Broad Complex transcription factors", *Dev. Genet.,* **22:** 141-159, 1998.

Rodríguez-Arnáiz, R., "Construcción de dos bases de datos de las pruebas mutagénicas (SLRLT y SCLT) de *Drosophila melanogaster*", *Memorias del III Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Mutágenos y Carcinógenos Ambientales,* Metepec, Puebla, 1991a.

———, "Construcción de una base de datos de las SMART *Drosophila melanogaster.* Valor predictivo de las pruebas mutagénica y recombinogénica de *Drosophila melanogaster*", *Memorias del III Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Mutágenos y Carcinógenos Ambientales,* Metepec, Puebla, 1991b.

———; Orozco, S.P.; Gaytán, O.J.C. y Graf, U., "Analysis of the mitotic recombination induced by several mono- and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing spot test", *Mutat. Res.,* **351:** 133-145, 1996.

———— ; Vogel, E.W. y Szakmary, A., "Strong intraspecific variability in the metabolic conversion of six procarcinogens to somatic cell recombinagens in *Drosophila", Mutagenesis,* **8:** 543-551, 1993.

———— y Ramos, M.P., "*Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos", *Serie los pequeños manuales*, Facultad de Ciencias, UNAM, 50, 1992.

Rubin, G.M., "*Drosophila melanogaster* as an experimental organism", *Science,* **240:** 1453-1459, 1988.

————, "Around the genomes: the *Drosophila* genome project", *Genome Res.,* **6:** 71-79, 1996.

———— ; Hong, L.; Brokstein, P.; Evans-Holm, M.; Frise, E. y cols., "A *Drosophila* complementary DNA resource", *Science,* **287:** 2222-2224, 2000.

Saner, C.; Weibel, B., Würgler, F.E. y Sengstag, C., "Metabolism of promutagens catalized by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*", *Environ. Mol. Mutagen.,* **27:** 46-58, 1996.

Snyder, M.J.; Stevens, J.L.; Andersen, J.F. y Feyereisen, R., "Expression of cytochrome P450 genes of the CYP4 family in midgut and fat body of the tobacco hornworm *Manduca sexta*", *Arch. Biochem. Biophys.,* **321:** 13-20, 1995.

Stern, C., "Somatic crossing over and segregation in *Drosophila melanogaster*", *Genetics,* **21:** 625-670, 1936.

Tang, A.H.; Tu, C.P.D., "Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D21", *J. Biol. Chem.,* **269:** 27876-27884, 1994.

Thaker, H.M. y Kankel, D.R., "Mosaic analysis gives an estimate of the extent of genomic involvement in the visual system in *Drosophila melanogaster*", *Genetics,* **131:** 883-894, 1992.

Tijet, N.; Helvig, C. y Feyereisen, R., "The cytochromne P450 superfamily in *Drosophila melanogaster*. Annotation, intron-exon organization and phylogeny", *Gene,* **262:** 189-198, 2001.

Valencia, R.; Abrahamson, S.; Lee, W.R.; Von Halle, E.S.; Woodruff, R.C.; Würgler, F.E. y Zimmering, S., "Chromosome mutation tests for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*", *Mutat. Res.,* **134:** 61-88, 1984.

Vogel, E.H., "Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell states", *Mutat. Res.,* **180:** 189-200, 1987.

———— y Szakmary, A., "Basic principles and evaluation of results of assays measuring genotoxic damage in somatic cells of *Drosophila*", en *Mutations and the environment. Part B,* Mendelshon, M.L. y Albertini, R.J., eds., Wiley Liss Inc., Nueva York, 149-158, 1991.

Vogel, E.W.; Nivard, J.M. y Zihilstra, J.A., "Variation of spontaneous and induced mitotic recombination in diffeerent populations, a pilot study on the effect of polyaromatic hydrocarbons in six newly constructed tester strains", *Mutat. Res.,* **250:** 291-298, 1991.

Waters, L.C.; Zelhof, A.C.; Shaw, B.J. y Ch'ang, L.Y., "Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in *Drosophila*", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **89:** 4855-4859, 1992.

Wilson, T.G., "Resistance of *Drosophila* to toxins", *Annu. Rev. Entomol.,* **46:** 545-571, 2001.

———— y Fabian, J., "A *Drosophila melanogaster* mutant resistant ti a chemical analog of juvenile hormone", *Dev. Biol.,* **118:** 190-201, 1986.

——— y Turner, C., "Molecular analysis of Methoprene-tolerant, a gene in *Drosophila* involved in resitance to juvenile hormone analog growth regulators", en *Molecular mechanisms of insecticide resistance: diversity among insects,* Mullin, C.A. y Scott, J.A., eds., Washington, DC, **505:** 99-112, 1992.

Woodruff, R.C.; Mason, J.M.; Valencia, R. y Zimmering, S., "Comparison of positive and negative control data for SLRL mutations and reciprocal translocations in three laboratories", *Environ. Mutag.,* **6:** 189-202, 1994.

PARTE VII

El origen de las células



Micrografía electrónica de una célula eucarionte.

CAPÍTULO 26

LA BIOLOGÍA MOLECULAR Y LA EVOLUCIÓN CELULAR TEMPRANA

Antonio Lazcano Araujo ■ **Arturo Becerra Bracho**



Introducción: la biología molecular y la reconstrucción filogenética

Hace apenas medio siglo que se propuso el modelo de la doble hélice de DNA y, en estas pocas décadas, la biología molecular se ha convertido en uno de los campos más provocadores de la investigación científica, ya que su rápido desarrollo ha permitido no sólo describir procesos celulares inéditos, sino que también ha provocado verdaderas revoluciones conceptuales dentro de las ciencias naturales. Sin duda alguna, la biología evolutiva ha sido una de las áreas más beneficiadas, ya que pudo implementar nuevas herramientas que permiten escudriñar en lo más íntimo de las relaciones filogenéticas, generando hipótesis que hubieran sido imposibles con los métodos convencionales.

En realidad, la aplicación de las técnicas moleculares al estudio de problemas evolutivos data de hace 100 años. En 1904 el fisiólogo George H. Nuttall publicó un libro donde resumía los resultados obtenidos de la comparación de sueros sanguíneos entre diferentes animales, con la intención de reconstruir las relaciones evolutivas que dichos organismos guardaban entre sí. "Cuando no se dispone de evidencia paleontológica", escribió Nuttall, "la relación filogenética entre los animales puede ser deducida basándose en la similitud de las estructuras de las formas actuales". Sin embargo, no fue sino hasta 1965 cuando Emile Zuckerkandl y Linus Pauling publicaron un trabajo en donde mostraban cómo la comparación de secuencias de aminoácidos o de nucleótidos permitía no sólo la construcción de filogenias moleculares, sino también, en algunos casos, datar los procesos de especiación, incluso cuando se carecía de información paleontológica. Durante cerca de 10 años, este enfoque permitió no solamente comparar proteínas como las hemoglobinas, el citocromo *c*, las ferrodoxinas y otras más, sino también construir árboles evolutivos que podían incluir organismos tan distintos entre sí como las bacterias y los hongos, lo cual hubiera sido imposible con los criterios morfológicos tradicionales.

> Fue hasta 1965 cuando Emile Zuckerkandl y Linus Pauling publicaron un trabajo en donde mostraban cómo la comparación de secuencias de aminoácidos o de nucleótidos permitía no sólo la construcción de filogenias moleculares, sino también, en algunos casos, datar los procesos de especiación, incluso cuando se carecía de información paleontológica.

Los genomas son documentos históricos extremadamente ricos de los cuales se puede extraer información evolutiva.

Diferentes macromoléculas pueden funcionar como cronómetros moleculares en la reconstrucción de filogenias universales.

La comparación evolutiva de las subunidades pequeñas del RNA ribosomal (rRNA), permitió la construcción de un árbol trifurcado sin raíz en el que todos los organismos conocidos quedaron agrupados en uno de los tres linajes celulares: *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya.*

La representación gráfica del contenido total de secuencias (es decir, fenogramas del contenido de secuencias) en los genomas completos secuenciados, mostró no sólo los tres dominios, sino incluso las distintas líneas biológicas.

Sin embargo, estos cambios han abierto nuevos debates, sobre todo en la apreciación del alcance y los límites de las metodologías moleculares. Algunos ejemplos de esta controversia se dan en la caracterización de las primeras células, el origen de los diferentes componentes de la célula eucarionte, y en la validez de los sistemas taxonómicos tradicionales. Es claro que el desarrollo pleno del potencial de las filogenias moleculares dependerá no sólo de refinamientos metodológicos que permitan mejorar los algoritmos que se usan para reconstruir la historia evolutiva con datos moleculares, sino también del análisis crítico de su armazón teórico, que incluye varios conceptos centrales adoptados directamente por la biología molecular de la teoría evolutiva clásica.

El reconocimiento de que los genomas son documentos históricos extremadamente ricos de los cuales se puede extraer información evolutiva ha incrementado el rango de estudios filogenéticos a niveles insospechados. El desarrollo de las técnicas de análisis de los ácidos nucleicos, que ha permitido la secuenciación de genomas completos, combinado con el rápido desarrollo de la informática, ha llevado no sólo a un crecimiento explosivo de información en los bancos de datos y nuevas herramientas sofisticadas para su análisis, sino también al reconocimiento de que diferentes macromoléculas pueden funcionar como cronómetros moleculares en la reconstrucción de filogenias universales.

El trabajo de este tipo más destacado ha sido la comparación evolutiva de las subunidades pequeñas del RNA ribosomal (rRNA), que permitió la construcción de un árbol trifurcado sin raíz en el que todos los organismos conocidos quedaron agrupados en uno de los tres linajes celulares: *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya* (Woese y cols., 1990). Aunque este tipo de análisis se puede criticar por su carácter reduccionista, es evidente que la identificación de estos tres linajes no es una ilusión provocada por el uso de una sola molécula como marcador evolutivo (figura 26-1). Por ejemplo, en 1999 tres grupos de trabajo demostraron, en forma independiente, que la representación gráfica del contenido total de secuencias (es decir, fenogramas

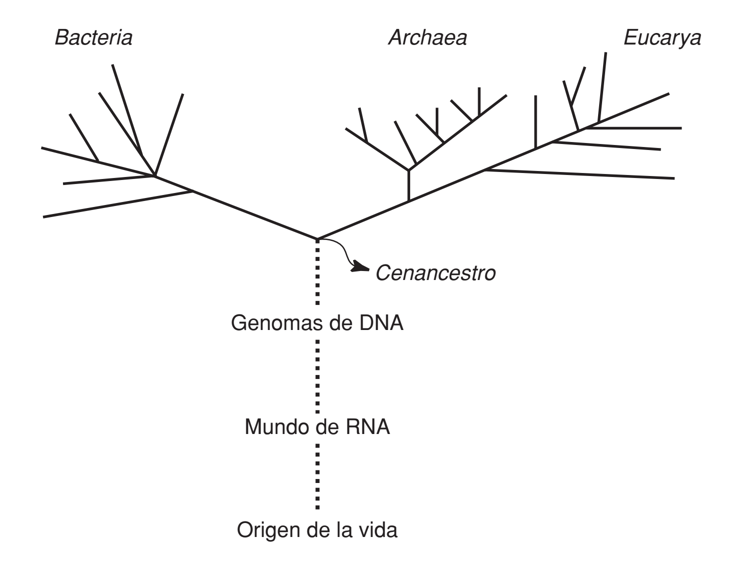


Figura 26-1. Reconstrucción filogenética de los tres dominios celulares, basada en 16S rRNA y su extrapolación al pasado prebiótico.

del contenido de secuencias) en los genomas completos secuenciados, mostró cómo no sólo los tres dominios, sino incluso las distintas líneas biológicas que las constituyen, se pueden identificar sin problemas (Snel y cols., 1999; Tekaia y cols., 1999a; Fitz-Gibbon y House, 1999). Por otro lado, también es cierto que la congruencia entre los árboles de rRNA y otras moléculas no siempre es ideal, ya que se han encontrado topologías que se escapan de lo esperado (Rivera y Lake, 1992; Gupta y Golding, 1993). Sin embargo, una variedad importante de árboles filogenéticos construidos con las DNA- y RNA-polimerasas, los factores de elongación, las subunidades hidrofílicas de ATPasas, las proteínas ribosomales y un número cada vez más grande de enzimas biosintéticas, ha confirmado una y otra vez la existencia de los tres principales linajes celulares (Doolittle y Brown, 1994; Doolittle, 1999).

Una variedad importante de árboles filogenéticos construidos con las DNA- y RNA-polimerasas, los factores de elongación, las subunidades hidrofílicas de ATPasas, las proteínas ribosomales y un número cada vez más grande de enzimas biosintéticas, ha confirmado una y otra vez la existencia de los tres principales linajes celulares.



El cenancestro o el último ancestro común de los linajes celulares

Aunque los tres linajes celulares están separados por una enorme distancia evolutiva, es evidente que todos ellos provienen de un ancestro común. Sin embargo, tanto la distancia filogenética que existe entre los tres linajes, como las diferencias moleculares que los separan, llevaron a Woese y Fox (1977) a sugerir que el ancestro común era una entidad mucho más simple que cualquier procarionte, en donde operaba una versión aún rudimentaria de la expresión de la información genética. Es decir, Woese y Fox supusieron que en el punto de la trifurcación de los tres linajes celulares había existido una entidad biológica hipotética a la que llamaron *progenote* y en la cual, a diferencia de lo que ocurre con los organismos contemporáneos, la separación entre genotipo y fenotipo aún no se había completado del todo.

Aunque los tres linajes celulares están separados por una enorme distancia evolutiva, es evidente que todos ellos provienen de un ancestro común.

Woese y Fox supusieron que en el punto de la trifurcación de los tres linajes celulares había existido una entidad biológica hipotética a la que llamaron *progenote*.

No era fácil aceptar esta idea. Es evidente que los organismos contemporáneos debieron haber sido precedidos por sistemas mucho más simples, pero la probabilidad de que el último ancestro común de las eubacterias, las arqueobacterias y el nucleocitoplasma de los eucariontes fuera un progenote resultaba difícil de conciliar con la similitud y la complejidad de los procesos moleculares básicos de cada uno de los linajes. Por otra parte, aunque se pueden proponer esquemas evolutivos que conduzcan a la separación simultánea de tres o más linajes, los procesos de especiación suelen ser dicotómicos, es decir, de un grupo ancestral se derivan dos. Por último, el grupo de Wolfram Zillig, un biólogo molecular alemán, demostró mediante reacciones inmunológicas cruzadas que las subunidades de las RNA-polimerasas DNA-dependientes de los eucariontes eran más parecidas en número y estructura a las de las arqueobacterias, que cualquiera de ellas a la de las eubacterias. Ello sugería la existencia de una afinidad evolutiva entre las arqueobacterias y el nucleocitoplasma, es decir, que ambos tenían un origen común. Sin embargo, el árbol de los 16/18S rRNA obtenido por Woese y Fox carece de raíz, es decir, no posee una polaridad que nos indique el orden temporal en que divergieron los tres linajes. En otras palabras,

La representación gráfica de las relaciones entre las secuencias de los rRNA no permite deducir cuál de los tres fenotipos es el más antiguo.

La comparación de las diferencias y similitudes que existen entre los tres linajes permite, en principio, conocer no sólo la relación evolutiva que guardan entre ellos, sino también las características de su ancestro, al que Walter Fitch designó como *cenancestro*.

Todo indica que el último ancestro común a los tres linajes celulares (y, por lo tanto, a todos los seres vivos) tenía la complejidad equivalente a la de cualquier procarionte contemporáneo y no era un progenote.

la representación gráfica de las relaciones entre las secuencias de los rRNA no permite deducir cuál de los tres fenotipos es el más antiguo.

La comparación de las diferencias y similitudes que existen entre los tres linajes permite, en principio, conocer no sólo la relación evolutiva que guardan entre ellos, sino también las características de su ancestro, al que Walter Fitch designó como *cenancestro*. Aunque hace una década las bases de datos no poseían la riqueza de nuestros días, tenían la información suficiente para intentar asomarse a los rasgos del último ancestro. A pesar de las limitaciones de esta metodología (que incluyen, en forma destacada, el problema del transporte horizontal de genes), los resultados fueron notables: todo indicaba que el cenancestro poseía, entre otros, a) un sistema de transcripción y traducción de tipo moderno, que incluía ribosomas con proteínas, factores de transcripción y una RNA-polimerasa DNA-dependiente oligomérica; b) metabolismo energético dependiente de ATPasas asociadas a membranas; c) biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y coenzimas, y d) presencia de un genoma de DNA (Lazcano y cols., 1992). Es decir, todo indica que el último ancestro común a los tres linajes celulares (y, por lo tanto, a todos los seres vivos) tenía la complejidad equivalente a la de cualquier procarionte contemporáneo y no era un progenote (Lazcano, 1995).

La reconstrucción de estadios ancestrales ha adquirido una perspectiva totalmente novedosa gracias a la disponibilidad, a partir de 1995, de un número creciente de genomas celulares completamente secuenciados. Como habían afirmado desde 1965 Zuckerkandl y Pauling, la historia evolutiva de un organismo está contenida en su genoma. Sin embargo, a menudo esta información es difícil de interpretar, debido a una serie de fenómenos biológicos que van desde la falta de preservación de la estructura primaria de los genes, hasta la existencia de niveles de redundancia de las secuencias cuya naturaleza no entendemos del todo, pasando por el transporte horizontal, una de las peores pesadillas que tienen que enfrentar los biólogos evolutivos.

Como se muestra en la figura 26-2, en principio sería fácil detectar el conjunto de genes del cenancestro, ya que éste estaría definido por el

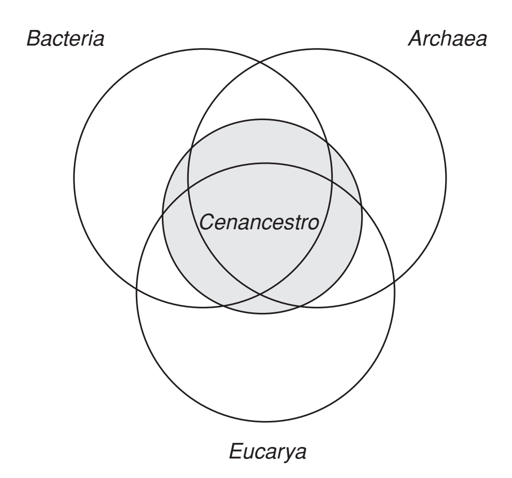


Figura 26-2. Los genes del cenancestro se pueden definir por el conjunto de secuencias presentes en la intersección de los conjuntos que representan los genomas de las *Archaea*, las *Bacteria* y las *Eucarya*.

conjunto de secuencias presentes en la intersección de los conjuntos que representan los genomas de las *Archaea*, las *Bacteria* y los *Eucarya*. Sin embargo, en la práctica esta reconstrucción se ha visto limitada por, a) el hecho de que los genomas secuenciados no reflejan a la diversidad biológica real; b) los distintos niveles de conservación de los genes, que distan mucho de ser los mismos para todas las secuencias; c) los problemas en la anotación e identificación de las secuencias presentes en las bases de datos; d) la presencia de secuencias altamente conservadas cuya función es aún completamente desconocida por no disponer de datos experimentales; e) la pérdida polifilética, es decir, independiente, de secuencias, funciones y rutas metabólicas que han sufrido diversos organismos, sobre todo parásitos y simbiontes, y f) el transporte lateral de los genes, que en algunos casos pueden traspasar las fronteras que separan a los grandes dominios.

Ante un inventario de dificultades como éste, parecería ser imposible definir con precisión los rasgos del último ancestro común; sin embargo, los resultados son alentadores. Por ejemplo, el transporte horizontal de secuencias es un fenómeno real (que subyace, por ejemplo, en la bien conocida resistencia a antibióticos que se observa con una frecuencia cada vez más alarmante entre muchos patógenos de humanos y animales) que puede oscurecer la reconstrucción del pasado evolutivo. Sabemos, por ejemplo, que incluso los operones del rRNA pueden llegar a sufrir este fenómeno, pero el hecho de que se mantenga la identidad de los grupos de microorganismos sugiere que existen limitaciones biológicas al intercambio de genes. A pesar de la promiscuidad con la que los seres vivos han intercambiado genes a lo largo de la evolución, la reconstrucción del pasado es posible (Snel y cols., 1999; Tekaia y cols., 1999a; Fitz-Gibbon y House, 1999).

La naturaleza de la célula eucarionte

La descripción tripartita del mundo viviente desarrollada por Woese y sus colaboradores ha sido rechazada por varios investigadores, que alegan que los dos grupos procariontes (es decir, las eubacterias y las arqueobacterias) son en realidad uno solo, ya que, independientemente de las diferencias al nivel molecular, ambos son procariontes (Mayr, 1990; Margulis y Guerrero, 1991; Cavalier-Smith, 1992). Además, debido a su naturaleza cladista, los árboles filogenéticos moleculares no permiten representar los procesos de anastomosis que se dieron entre los linajes durante la formación de los diferentes componentes de la célula eucarionte. Así, Margulis y Guerrero (1991) han argumentado que, si bien la cladística molecular es la principal herramienta en la reconstrucción filogenética, las clasificaciones taxonómicas no se pueden basar únicamente en la comparación evolutiva de macromoléculas, sino también en la información que brindan las rutas metabólicas, la citología, la morfología ultraestructural, los datos bioquímicos, los ciclos de vida y,

cuando estén disponibles, el registro paleontológico y la evidencia geoquímica.

En 1967, Lynn Margulis propuso que las células eucariontes eran en realidad minúsculas comunidades microbianas que habían resultado de una serie de procesos endosimbióticos.

En 1967, Lynn Margulis propuso que las células eucariontes eran en realidad minúsculas comunidades microbianas que habían resultado de una serie de procesos endosimbióticos, es decir, que las células nucleadas habían sido precedidas por procariontes que luego se asociaron simbióticamente. Aunque la idea de que mitocondrias y cloroplastos eran descendientes de bacterias de vida libre había circulado en algunos medios científicos desde finales del siglo XIX, Margulis (1967) no sólo revivió en forma independiente la teoría endosimbiótica, sino que la articuló y apoyó con una serie de evidencias morfológicas, bioquímicas, genéticas e incluso geológicas tan contundentes que sus puntos de vista terminaron por ser aceptados incluso por sus críticos más severos.

Cuando Margulis propuso por primera vez su teoría endosimbiótica, no estaba clara la naturaleza biológica del hospedero que había alojado a las bacterias que luego se convirtieron en mitocondrias, cloroplastos y undulipodia, es decir, no se tenía una idea precisa sobre el origen del nucleocitoplasma. Los micoplasmas, parásitos intracelulares que carecen de pared celular, parecían ser buenos candidatos, debido a su metabolismo estrictamente fermentativo (como el del citoplasma eucarionte) y a que la ausencia de pared hubiera facilitado la entrada de los endosimbiotes. La idea de la endosimbiosis fue ganando cada vez más adeptos y pronto se convirtió en una de las bases de la clasificación de los seres vivos en cinco reinos. Así, a pesar de que para entonces era cada vez más evidente la existencia de algunas diferencias en los procesos de replicación y expresión genética entre los procariontes y los eucariontes, hacia mediados de la década de 1970 la mayoría de los biólogos consideraban que todos los componentes de las células nucleadas provenían de un mismo linaje bacteriano.

Las filogenias moleculares han determinado, sin lugar a dudas, el origen endosimbiótico de los plástidos y la mitocondria. Sin embargo, un número importante de árboles filogenéticos sugiere que buena parte del nucleocitoplasma eucarionte se originó de una célula arqueobacteriana (y no de una bacteria tipo micoplasma) cuyos descendientes conforman al grupo monofilético de los eucariontes (Gogarten-Boekels y Gogarten, 1994). Como afirmaron Woese y cols., aunque la presencia de endosimbiontes es de importancia central para los eucariontes, es innegable que éstos tienen una única filogenia principal (Wheelis y cols., 1992). Mientras este punto de vista asume una continuidad absoluta entre el nucleocitoplasma y su antepasado directo, los argumentos holistas de Margulis y Guerrero (1991), Cavalier-Smith (1992) y otros más, ponen énfasis en la emergencia evolutiva de un nuevo tipo de célula como un resultado de procesos endosimbióticos. Por lo tanto, el proceso principal de transición a eucariontes fue la adquisición evolutiva de simbiontes intracelulares y, en consecuencia, se puede afirmar que la rama de los eucariontes de los tres linajes celulares propuesta por Woese no representa a las cé-

lulas eucariontes en su conjunto, sino únicamente parte de su compleja historia.



Conclusiones

Aunque en los últimos años la relación entre la biología molecular y el estudio de las filogenias celulares ha enfrentado un número enorme de críticas y conflictos, el rápido desarrollo de las bases de datos de secuencias moleculares ha proporcionado una visión única de la evolución de las células procariontes y eucariontes, abriendo nuevas perspectivas en varios campos de las ciencias naturales. La evolución molecular resultó originalmente de la unión de la biología molecular con las ideas neodarwinistas, pero actualmente se ha transformado en un campo con vida e identidad propias. Sin embargo, su desarrollo pleno requiere no sólo del desarrollo de técnicas de secuenciación macromolecular menos caras y más rápidas y de algoritmos y computadoras más poderosas para la reconstrucción de hipótesis filogenéticas, sino, sobre todo, del incremento del conocimiento de su objeto de estudio, así como definiciones más precisas de su armazón conceptual.

Al igual que ocurre en otras áreas del conocimiento, pocas tareas resultan tan complejas y difíciles como la reconstrucción del pasado biológico. Si bien es cierto que en el marco de la teoría evolutiva es fácil aceptar la existencia de sistemas ancestrales más simples de los cuales descendemos los organismos actuales, su estudio no es una tarea fácil, sobre todo si, como ocurre en el caso del cenancestro, hay que remontarse a épocas precámbricas. La reconstrucción de estadios ancestrales es una tarea multi e interdisciplinaria que tiene que recurrir a actitudes eclécticas que apelen a metodologías que van desde las discusiones sobre el medio ambiente primitivo, hasta la anotación automatizada de las secuencias de genomas completos.

Los resultados pueden ser confusos. Por ejemplo, la conservación de las secuencias de las ATPasas implica la existencia de membranas de lípidos y fosfolípidos, aunque no podemos saber cuál era la naturaleza química de estas últimas. A pesar de estas dificultades, resulta asombroso que existan secuencias, estructuras y funciones, como las que participan en la expresión de la información genética, que se han conservado a lo largo de miles de millones de años. La lectura de estas crónicas moleculares que se han mantenido desde épocas precámbricas nos permite asomarnos, aunque sea en forma limitada, al interior de los procesos biológicos de las células que antecedieron a todas las formas de vida que existen hoy en nuestro planeta.



Referencias bibliográficas

Cavalier-Smith, T., "The number of symbiotic origins of organelles", *Biosystems,* **28(1-3):** 91-106, 1992.

Doolittle, W.F., “Phylogenetic classification and the universal tree”, *Science,* **284:** 2124-2128, 1999.

——— y Brown, J.R., “Tempo, mode, the progenote and the universal root”, *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **91:** 6721-6728, 1994.

Fitch, W.M. y Upper, K., “The phylogeny of tRNA sequences provides evidence of ambiguity reduction in the origin of the genetic code”, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.,* **52:** 759-767, 1987.

Fitz-Gibbon, S.T. y House, C.H., “Whole genome-based phylogenetic analysis of free-living microorganisms”, *Nucleic Acid Res.,* **27:** 4218-4222, 1999.

Gogarten, J.P.; Kibak, H.; Dittrich, P.; Taiz, L.; Bowman, E.J.; Bowman, B.J.; Manolson, M.L.; Poole, J.; Date, T.; Oshima; Konishi, L.; Denda, K. y Yoshida, M., “Evolution of the vacuolar H^+-ATPase, implications for the origin of eukaryotes”, *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **86:** 6661-6665, 1989.

Gogarten-Boekels, M. y Gogarten, J.P., “The effects of heavy meteorite bombardment on the early evolution of life —a new look at the molecular record”, *Origins of Life and Evol. Biosph***.,** **25:** 78-83, 1994.

Gupta, R.S. y Golding, G.B., “Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaeabacteria, eubacteria, and eukaryotes”, *J. Mol. Evol.,* **37:** 573-582, 1993.

Iwabe, N.; Kuma, K.; Hasegawa, M.; Osawa, S. y Miyata, T., “Evolutionary relationship of archaeabacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes”, *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **86:** 9355-9359, 1989.

Kandler, O., “The early diversification of life”, en *Early Life on Earth, Nobel Symposium,* Bengtson, S., ed., Columbia University Press, Nueva York, **84:** 124-131, 1994.

Lazcano, A., “Cellular evolution during the early Archaean: what happended between the progenote and the cenancestor?”, *Microbiologia SEM.,* **11:** 1-13, 1995.

———; Fox, G.E. y Oró, J., “Life before DNA, the origin and evolution of early Archaean cells”, en *The Evolution of Metabolic Function*, Mortlock, R.P., ed., CRC Press, Boca Ratón, 237-295, 1992.

Margulis, L., *Symbiosis in Cell Evolution*, Freeman, W.H., Nueva York, 1993.

——— y Guerrero, R., “Kingdoms in turmoil”, *New Scientist,* **132:** 46-50, 1991.

Mayr, E., “A natural system of organisms”, *Nature,* **348:** 491, 1990.

Nuttall, G.H.F., *Blood Immunity and Blood Relationship: a demonstration of certain blood-relationships amongst animals by means of the precipitation test for blood,* Cambridge University Press, Cambridge, 1904.

Rivera, M.C. y Lake, J.A., “Evidence that eukaryotes and eocyte prokaryotes are inmediate relatives”, *Science,* **257:** 74-76, 1992.

Snel, B.; Bork, P. y Huynen, M.A., “Genome phylogeny based on gene content”, *Nature Genetics,* **21:** 108-110, 1999.

Tekaia, F.; Lazcano, A. y Dujon, B., “The genomic tree as revealed from whole proteome comparisons”, *Genome Research,* **9:** 550-557, 1999.

——— y Dujon, B., “Pervasiveness of gene conservation and persistence of duplicates in cellular genomes”, *J. Mol. Evol.*, **49:** 591-600, 1999.

Wheelis, M.L.; Kandler, O. y Woese, C.R., “On the nature of global classification”, *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **89:** 2930-2934, 1992.

Woese, C.R., “Bacterial evolution”, *Microbiol. Reviews,* **51:** 221-271, 1987.

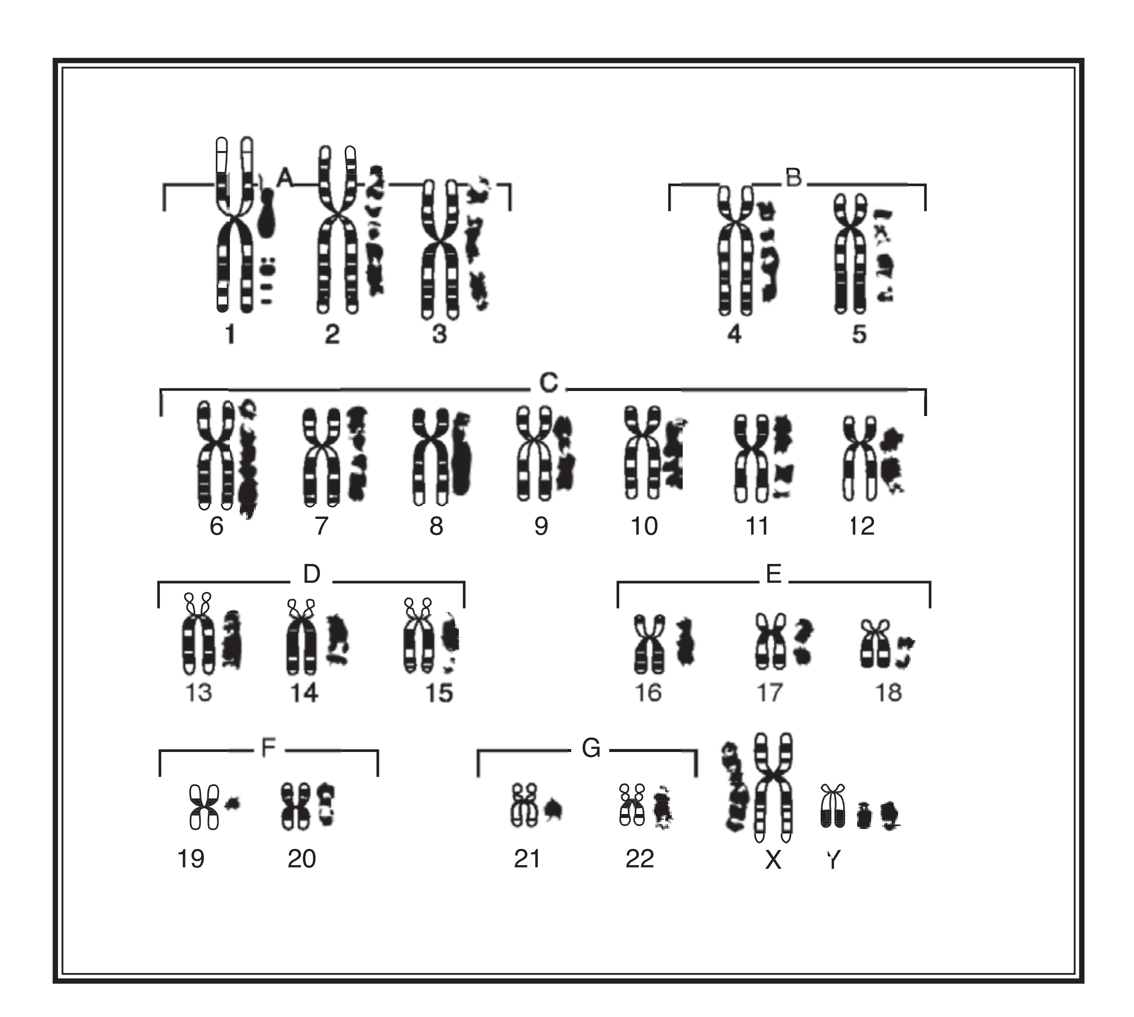
———; Kandler, O. y Wheelis, M.L., "Towards a natural system of organisms, proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **87:** 4576-4579, 1990.

——— y Fox, G.E., "The concept of cellular evolution", *Jour. Mol. Evol.,* **10:** 1-6, 1977.

Zuckerkandl, E. y Pauling, L., "Molecules as documents of evolutionary history", *J. Theoret. Biol.,* **8:** 357-366, 1965.

PARTE VIII

El genoma humano



Bandas Q en los cromosomas humanos. Aparece el esquema representativo de este patrón de bandas.

CAPÍTULO 27

LOS CROMOSOMAS HUMANOS

Fabio Abdel Salamanca Gómez



Introducción

Los genes son las unidades orgánicas que controlan la herencia y se encuentran arreglados linealmente en los *cromosomas*, ocupando cada gen un *sitio* o *locus* específico. Por su tamaño submicroscópico, los genes no pueden observarse directamente, pero los cromosomas, que son los elementos intracelulares que los transportan, pueden estudiarse directamente con el microscopio de luz.

> Los genes son las unidades orgánicas que controlan la herencia y se encuentran arreglados linealmente en los *cromosomas*, ocupando cada gen un *sitio* o *locus* específico.

Todas las células tienen cromosomas localizados dentro de su núcleo. Cada célula somática normal de un individuo dentro de la misma especie tiene un número constante de cromosomas, que en los organismos de reproducción sexual se denomina *número cromosómico diploide* (2n). En tales organismos, las células encargadas de la reproducción, llamadas *gametos,* tienen un número cromosómico igual a la mitad del número diploide, el denominado *número haploide o simple* (n). Así, por ejemplo, un individuo de la especie humana tiene 46 cromosomas en las células somáticas y 23 en los gametos, el óvulo o el espermatozoide. El proceso por el cual el número cromosómico se reduce a la mitad se denomina *meiosis* (del griego, *meios*, mitad, y *osis*, estado o condición).

> Cada célula somática normal de un individuo dentro de la misma especie tiene un número constante de cromosomas, que en los organismos de reproducción sexual se denomina *número cromosómico diploide* (2n).

Cuando la fertilización ocurre, un espermatozoide (gameto masculino) penetra dentro del óvulo (gameto femenino) y, como cada uno de estos gametos trae 23 cromosomas, la célula que ha resultado de esa unión tendrá 46 cromosomas. Esta célula totipotencial, denominada cigoto, mediante un largo y laborioso proceso de diferenciación y desarrollo, dará origen a un individuo adulto con millones de células en su organismo, cada una de ellas con 46 cromosomas, a excepción de sus células gaméticas. El proceso de división celular que ha mantenido este número constante, a partir del cigoto, recibe el nombre de *mitosis* (del griego *mitos*, hilo, y *osis*, estado o condición).

> El proceso por el cual el número cromosómico se reduce a la mitad se denomina *meiosis*.

De los 46 cromosomas de cada ser humano, 23 son aportados por el padre y 23 por la madre.

De los 46 cromosomas de cada ser humano, 23 son aportados por el padre y 23 por la madre. Esto hace que el complemento cromosómico humano normal esté formado en realidad por 23 pares de cromosomas; cada miembro de un par de cromosomas ha sido dado por un progenitor. De los 23 pares, 22 son comunes al hombre y la mujer, y se denominan *autosomas*; el par restante recibe el nombre de *gonosomas* o *cromosomas sexuales* y son dos cromosomas X en la mujer (46,XX) y un X y un Y en el varón (46,XY) (figura 27-1). Por consiguiente, los óvulos normales llevarán siempre 22 autosomas y un cromosoma X, mientras que los espermatozoides normales llevarán todos 22 autosomas, pero aproximadamente la mitad de ellos portará un cromosoma X y la otra mitad un cromosoma Y. Si un espermatozoide que lleva el cromosoma X es el que fecunda, el producto resultante será una mujer: si el espermatozoide lleva el cromosoma Y, el producto será un varón (figura 27-2).

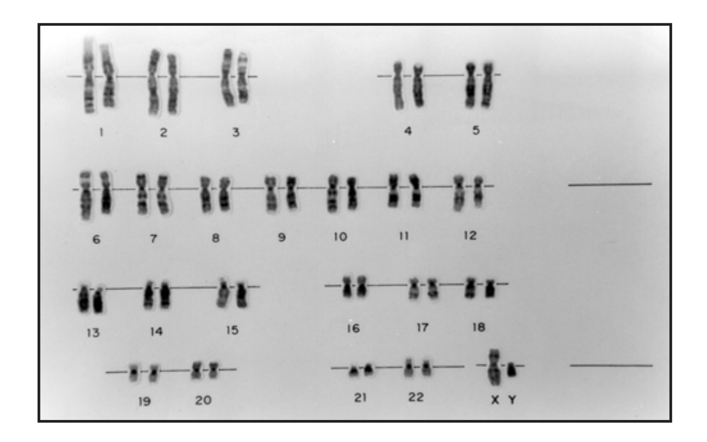


Figura 27-1. Cariotipo de un individuo normal de sexo masculino, cuyos cromosomas revelan el patrón de bandas G.

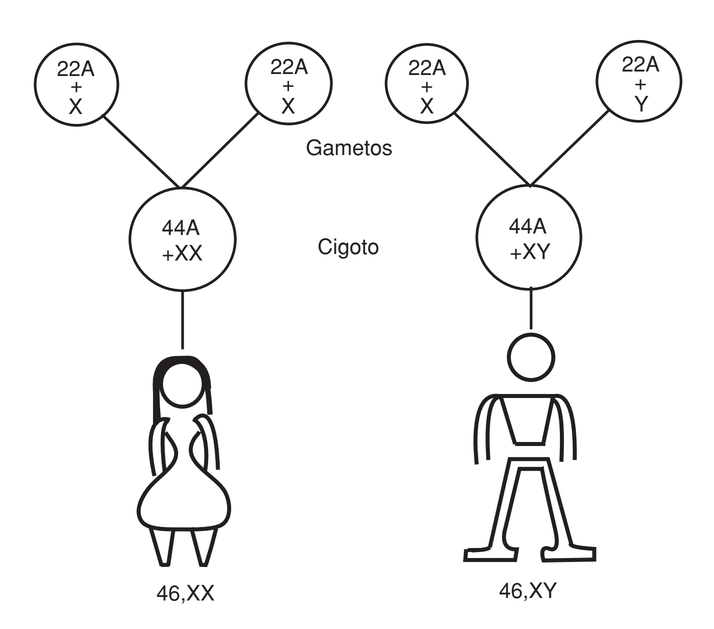


Figura 27-2. Determinación de sexo por los gonosomas.

Los cromosomas que forman cada par se llaman *cromosomas homólogos*, y los genes que ocupan los mismos *loci* (lugares) en los cromosomas homólogos se denominan *alelos*.

Los cromosomas que forman cada par se llaman *cromosomas homólogos*, y los genes que ocupan los mismos *loci* (lugares) en los cromosomas homólogos se denominan *alelos*.



División celular

El proceso de división celular por el cual una célula da origen a dos células idénticas con igual dotación de cromosomas, se denomina mitosis. En el caso de las células somáticas humanas cada célula que se divide da lugar a dos células hijas con 46 cromosomas.

El proceso de división celular por el cual una célula da origen a dos células idénticas con igual dotación de cromosomas, se denomina mitosis.

Cuando no se manifiestan los fenómenos de la división, se dice que la célula está en el periodo de *interfase*, en el cual los cromosomas están muy alargados, formando una fina red dentro del núcleo.

La mayoría de las células del organismo se divide periódicamente, siendo notables excepciones las neuronas y los miocitos. Para lograr esta división, ocurren transformaciones y fenómenos que se suceden en forma cíclica, constituyendo lo que se denomina el *ciclo celular* (figura 27-3). Para dividirse, la célula ha tenido que duplicar previamente su material genético, lo cual ocurre durante el periodo S o sintético del ciclo, por lo que en periodo G_1 (presintético) cada cromosoma estará constituido por una simple cromátida, mientras que, después del periodo S, en el periodo G_2 (post-sintético), ya aparecerán formados por dos cromátidas unidas por el centrómero. Al final del periodo G_2, ocurren las fases que constituyen la mitosis propiamente dicha y que se suceden en un tiempo de una a dos horas. La mitosis es un proceso continuo, pero se describe formada por las

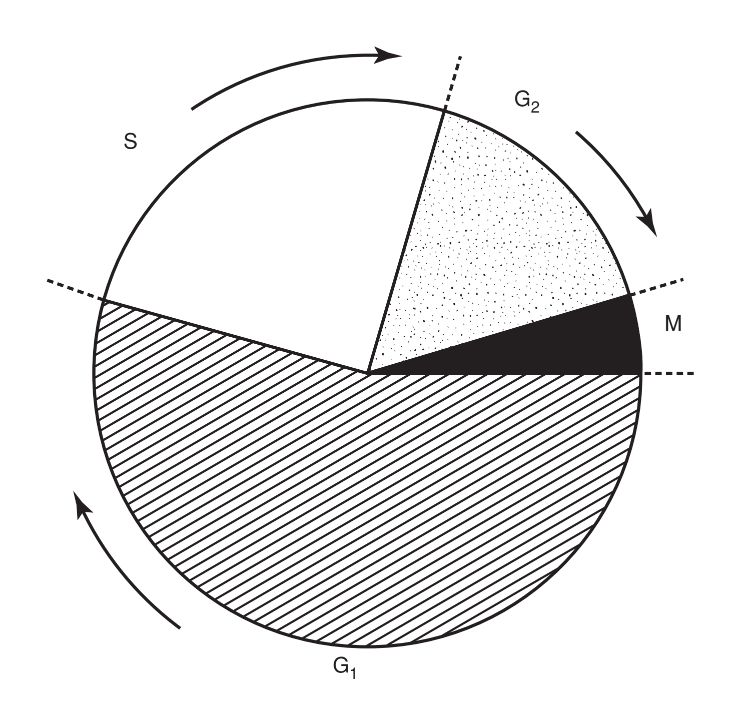


Figura 27-3. Representación esquemática del ciclo celular.

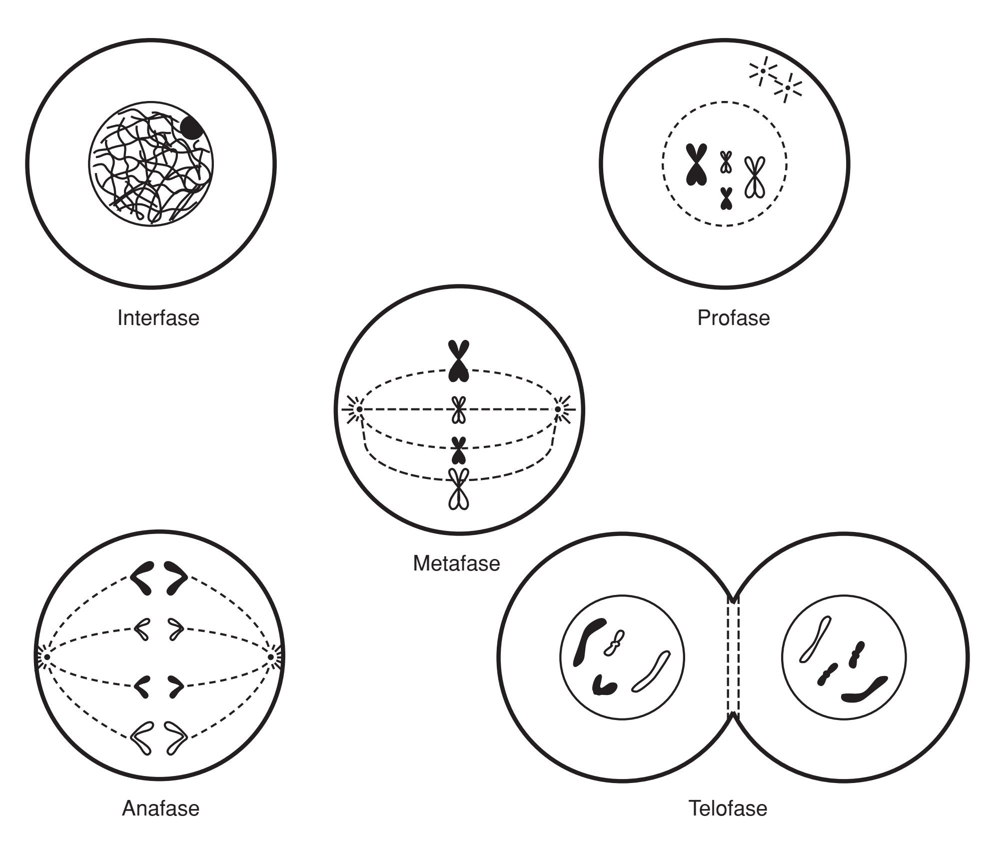


Figura 27-4. Fases de la mitosis.

fases consecutivas que se definen según las características morfológicas que van presentando los cromosomas: profase, metafase, anafase y telofase (figura 27-4).

En la *profase*, los cromosomas que ya se habían duplicado en el periodo de síntesis (periodo S) de la interfase, se han ido acortando y aparecen como bastones compactos, por un proceso de espirilización. La membrana nuclear deja de hacerse visible y son visibles los centriolos, los cuales también se han duplicado, migrando uno de ellos por la periferia del núcleo hacia el otro polo de la célula, los centriolos son los sitios donde se ensambla la *tubulina*, la cual es la subunidad proteica de los microtúbulos. El *huso acromático* comienza a aparecer entre los dos centriolos.

En la *metafase*, los cromosomas se colocan en el plano ecuatorial de la célula y aparecen unidos por el centrómero al huso acromático. En este estadio, mediante las técnicas de cultivo de tejidos y el empleo de sustancias como la colchicina, que impiden la formación del huso, se pueden observar mejor los cromosomas al microscopio.

En la *anafase*, ocurre la división longitudinal del centrómero, lo que permite que cada cromátida se separe y, unida por su centrómero al huso acromático, migre hacia el polo respectivo de la célula.

En la *telofase*, se forman dos núcleos hijos (cariocinesis) y el citoplasma también completa su división (citocinesis), mediante un plegamiento de la membrana que comienza desde la periferia, en la parte media, y va progresando hacia el centro de la célula, de tal suerte que finalmente se obtienen dos células hijas con igual dotación de cromosomas y de citoplasma (división ecuacional).

La *meiosis* permite la reducción del número de cromosomas por medio de dos sucesivas divisiones celulares, denominadas primera y segunda divisiones meióticas; sólo una de ellas, la primera, ha sido precedida de la duplicación de los cromosomas (figura 27-5).

La *meiosis* permite la reducción del número de cromosomas por medio de dos sucesivas divisiones celulares, denominadas primera y segunda divisiones meióticas.

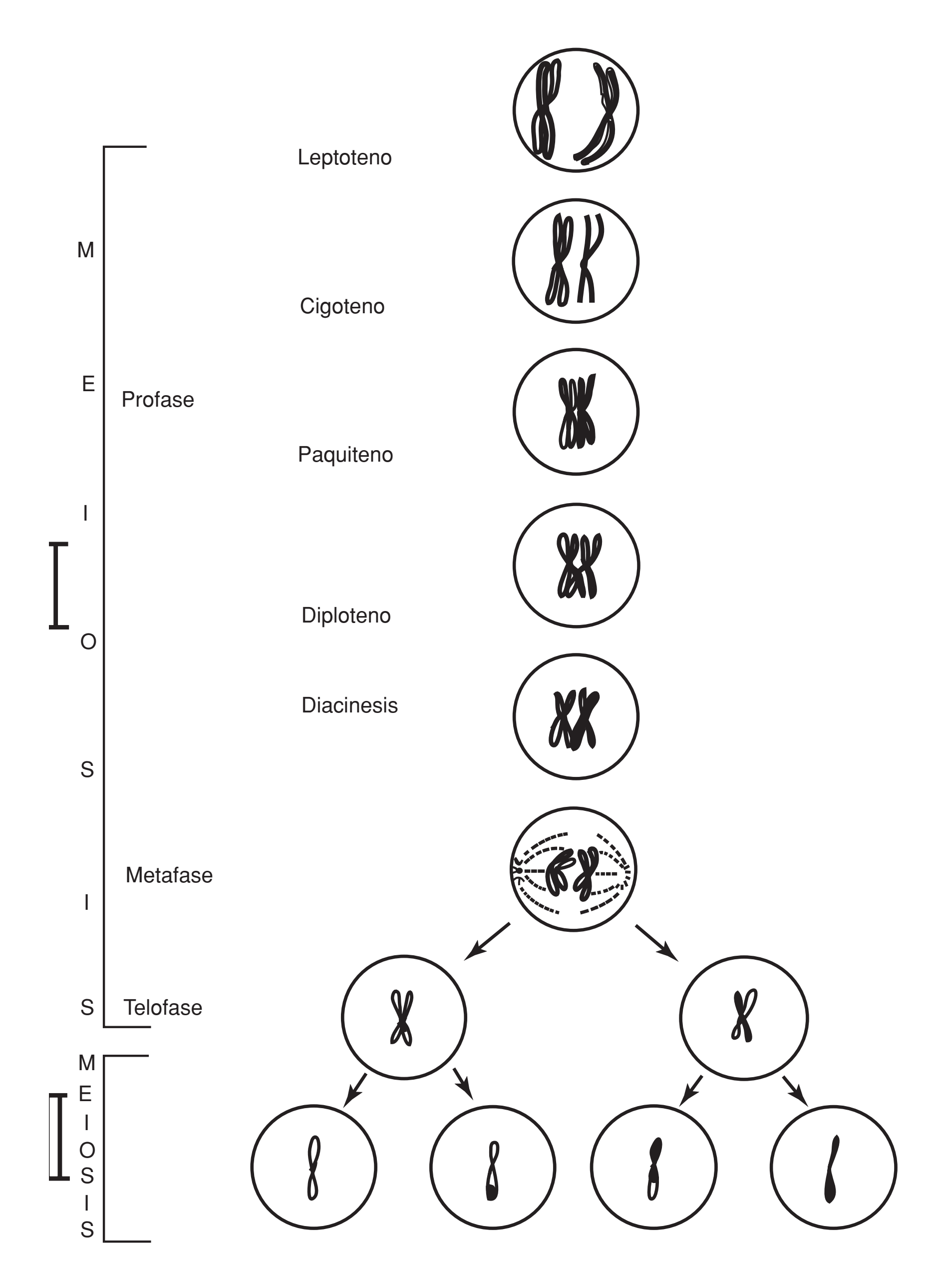


Figura 27-5. Esquema de la división por meiosis.

Los cromosomas homólogos se aparean en la primera división de la meiosis y realizan un proceso de intercambio de material genético, denominado *entrecruzamiento* (*crossing-over*), que tiene notable importancia en la evolución y variación genética de las especies que se reproducen sexualmente.

En la profase de la primera división meiótica, los cromosomas homólogos se aparean o sinapsan en toda su longitud, formando los llamados bivalentes y luego intercambian porciones de su material en lo que constituye el entrecruzamiento, el cual se manifiesta citológicamente por los llamados *quiasmas*.

En la metafase de la primera división meiótica, los cromosomas bivalentes, después de haber llevado a cabo el entrecruzamiento, se colocan en el plano ecuatorial de la célula, orientando sus centrómeros hacia cada uno de los polos y, durante la anafase, los dos cromosomas de cada par se separan, dirigiéndose cada uno de ellos al polo celular correspondiente. Esta separación de los homólogos constituye la base física de la segregación de los alelos.

En la telofase, se completa la primera división de meiosis, la cual es seguida por la meiosis II. En la metafase II, los cromosomas se colocan en el plano ecuatorial de la célula y en la anafase II ocurre la división longitudinal del centrómero, completándose la migración hacia los polos en la telofase II.

Por consiguiente, cada una de las dos células obtenidas en la meiosis I originará a su vez otras dos, o sea cuatro en total, cada una de ellas con un número simple o haploide de 23 cromosomas en condiciones normales.

La meiosis presenta diferencias importantes según se trate del varón o de la mujer. En el varón, la espermatogénesis tiene lugar en el testículo, en donde los espermatogonios que se encuentran en la pared de los túbulos seminíferos se multiplican activamente por mitosis. Los más maduros se van acercando a la luz del túbulo y se transforman en los *espermatocitos primarios* que son las células que inician la meiosis (figura 27-6).

Cada espermatocito primario, al final de la meiosis I, origina dos *espermatocitos secundarios* y cada uno de éstos, en la división de meiosis II, dará lugar a dos espermátidas que se transformarán, durante el proceso de espermatogénesis, en los *espermatozoides* o *gametos masculinos*. Así, de un espermatocito primario se forman cuatro espermatozoides, dos llevan cromosoma X y dos cromosoma Y, pero, desde luego si son normales, todos tienen 23 cromosomas e igual cantidad de citoplasma.

El ciclo de la espermatogénesis dura en el hombre aproximadamente 74 días y en cada eyaculación se liberan más de 60 millones de espermatozoides.

En la mujer, el *ovocito primario* produce un solo gameto funcional, el *óvulo*, que posee mayor cantidad de citoplasma gracias a una división desigual que, además del óvulo, produce tres pequeños corpúsculos polares que degeneran y se eliminan (figura 27-7). Como el complemento gonosómico en la mujer es XX el óvulo, por supuesto en condiciones normales portará sólo el cromosoma X.

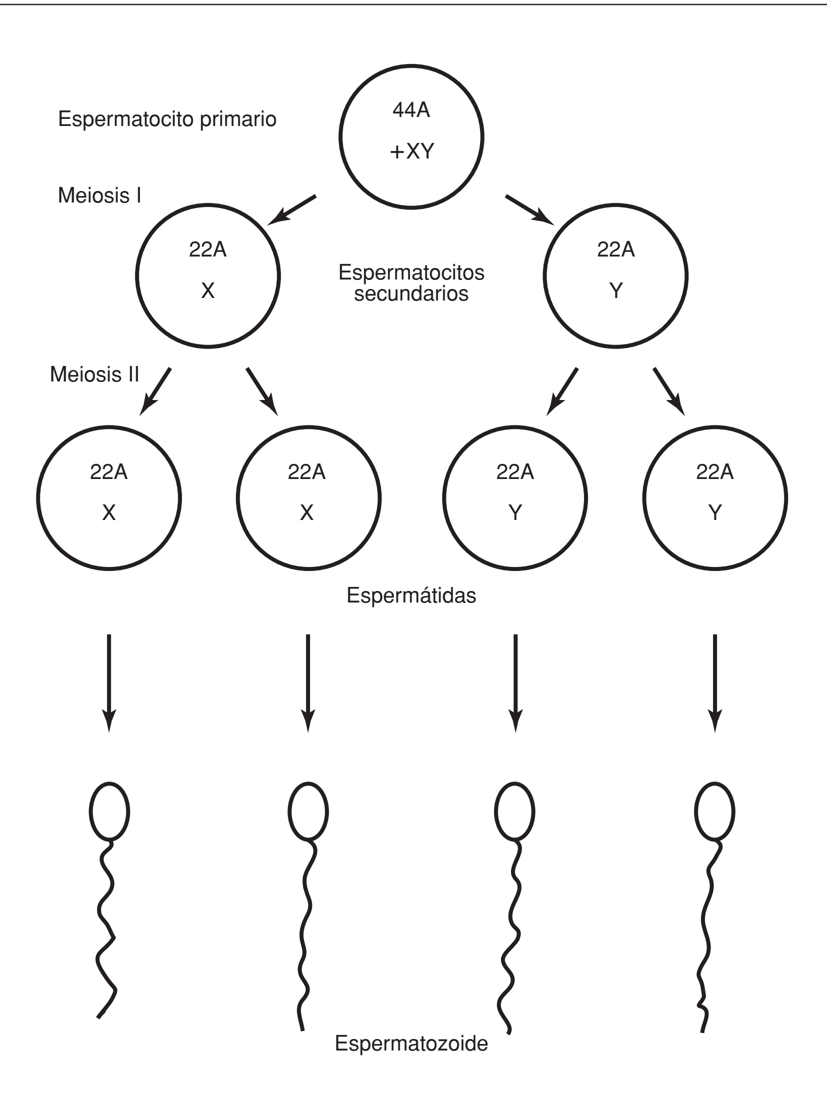


Figura 27-6. Espermatogénesis en el hombre.

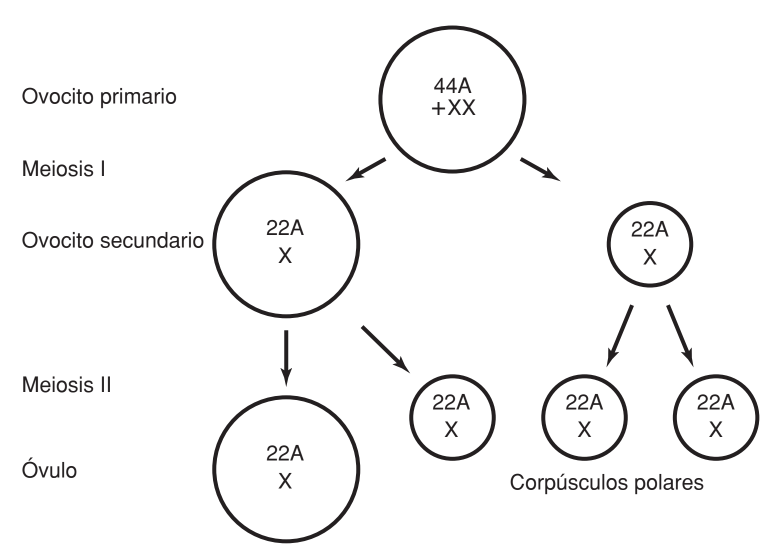


Figura 27-7. Formación de los gametos en la mujer.

Otra diferencia importante con la meiosis del varón estriba en que, al nacimiento, la niña ya ha iniciado la primera división de meiosis en sus más de 300 mil ovocitos primarios, pero esta meiosis se ha detenido en un estadio que se denomina *dictioteno*. Es por esta razón que la edad materna y no la edad paterna tiene influencia en la no separación o no disyunción cromosómica durante la meiosis.

Sólo unos 400 ovocitos primarios completarán la división meiótica y se transformarán en óvulos, ya que, a partir de la pubertad y hasta la menopausia, con cada ciclo menstrual un ovocito alcanza su maduración.

La fertilización es el proceso de la penetración espermática dentro del huevo y la unión de los gametos paterno y materno que resulta en la formación del *cigoto*, el cual tendrá el número cromosómico diploide de la especie correspondiente.

Los cromosomas no sólo tienen un número constante en cada especie, sino que, además, presentan estructura y morfología definidas.

El cariotipo humano

Cada cromosoma consta de dos cromátidas unidas por una constricción primaria que es el centrómero.

De acuerdo con la localización del centrómero, hay tres tipos de cromosomas en el humano.

Mediante el cultivo de linfocitos de sangre periférica o por medio de muestras obtenidas de biopsias de piel o de otros tejidos, es posible observar los cromosomas con el microscopio. Los cromosomas no sólo tienen un número constante en cada especie, sino que, además, presentan estructura y morfología definidas. Como ya se mencionó, los cromosomas se analizan durante la profase tardía o durante la metafase, en las cuales cada cromosoma consta de dos cromátidas unidas por una constricción primaria que es el centrómero.

De acuerdo con la localización del centrómero, hay tres tipos de cromosomas en el humano (figura 27-8):

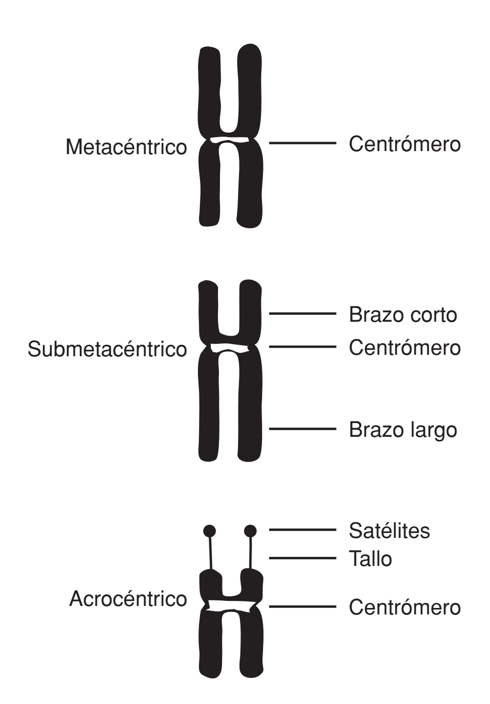


Figura 27-8. Morfología cromosómica según la localización del centrómero.

1. Si el centrómero está localizado en la parte media, el cromosoma se llama *metacéntrico* y, por supuesto, los brazos son sensiblemente iguales.
2. Si el centrómero está más cerca de uno de los extremos que del otro, estableciéndose así claramente un *brazo corto* (p) y un *brazo largo* (q), el cromosoma es *submetacéntrico*.
3. Si el centrómero está situado muy próximo a uno de los extremos, siendo el brazo corto muy reducido, el cromosoma es *acrocéntrico*. Los 10 cromosomas acrocéntricos del humano tienen, además, en el brazo corto unas formaciones que recuerdan palillos de tambor que se denominan *satélites*.

El *cariotipo* es el ordenamiento de los cromosomas de acuerdo con su tamaño y con la localización del centrómero. Los cromosomas humanos se han ordenado en siete grupos que se designan por letras (figura 27-9):

El *cariotipo* es el ordenamiento de los cromosomas de acuerdo con su tamaño y con la localización del centrómero.

Grupo A: Son los cromosomas más grandes del cariotipo e incluye a los pares 1, 2 y 3; el 1 y el 3 son metacéntricos, mientras que el 2 es submetacéntrico.

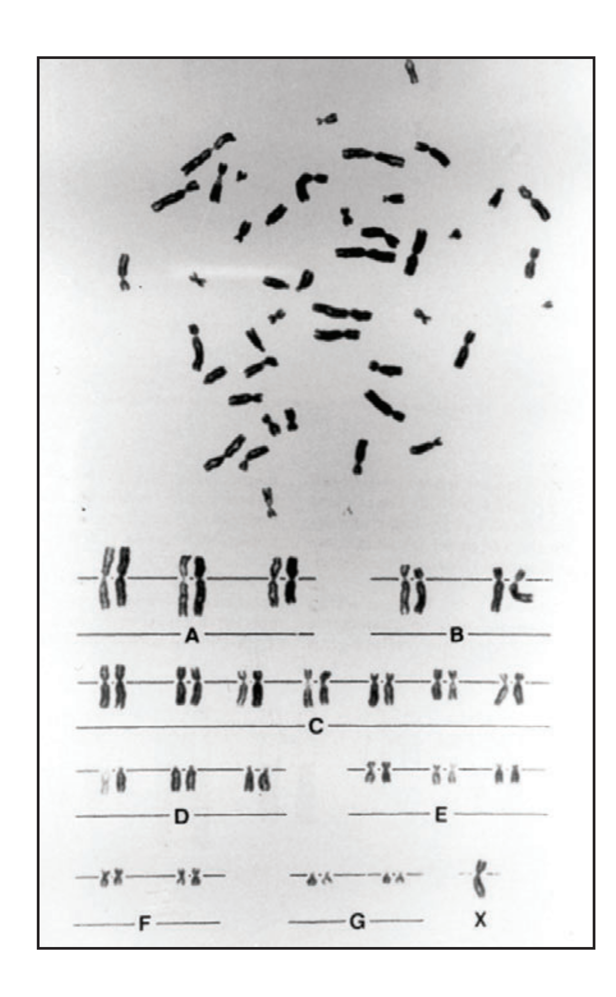


Figura 27-9. Ordenamiento de los cromosomas por grupos.

Grupo B: Comprende los pares 4 y 5 que son submetacéntricos y de morfología muy similar.

Grupo C: A este grupo pertenecen los pares autosómicos 6 al 12, que son submetacéntricos; por su tamaño, se incluye en este grupo al gonosoma X.

Grupo D: Corresponden a este grupo los pares 13, 14 y 15, los cuales son acrocéntricos y presentan, como ya se anotó, satélites en sus brazos cortos.

Grupo E: Forman este grupo los pares 16, 17 y 18, que son submetacéntricos, pero el 16 presenta su centrómero más próximo a la parte media y tiene una constricción secundaria en su brazo largo.

Grupo F: Son los pares 19 y 20, con apariencia de metacéntricos pequeños.

Grupo G: Está integrado por los pares 21 y 22, que son los más pequeños del cariotipo, acrocéntricos y con satélites. Se incluye por su tamaño en este grupo al gonosoma Y, el que, sin embargo, carece de satélites.

Sólo hasta años recientes ha sido posible identificar con precisión cada uno de los pares de cromosomas que constituyen el cariotipo, gracias al desarrollo de procedimientos que se conocen como *técnicas de bandas*. Por diferentes metodologías, los cromosomas no aparecen uniformemente teñidos como con las técnicas usuales, sino formados por una secuencia de segmentos claros y obscuros, o fluorescentes y no fluorescentes, que forman las denominadas *bandas* (figura 27-10). Más recientemente, mediante el empleo de sondas moleculares específicas, se ha desarrollado la metodología de hibridación *in situ* por fluorescencia o FISH, por sus siglas en inglés.

Todos estos procedimientos han sido de gran utilidad, porque han permitido establecer correlaciones más precisas entre los síndromes clí-

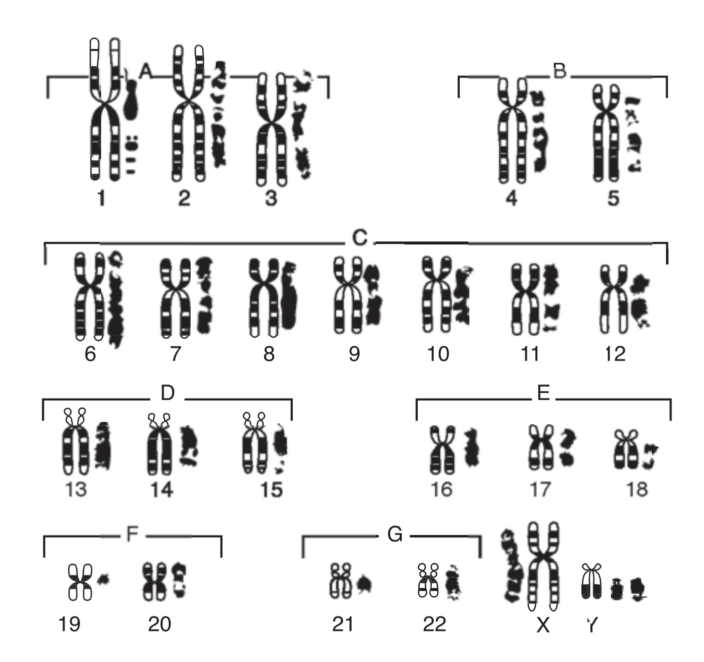


Figura 27-10. Bandas Q en los cromosomas humanos. Aparece el esquema representativo de este patrón de bandas.

nicos dismorfológicos y las alteraciones cromosómicas que los ocasionan, muchas de las cuales pasaban desapercibidas con las técnicas de rutina. Igualmente han hecho posible la localización de los genes a lo largo de la estructura cromosómica, un componente importante del Proyecto del Genoma Humano.



Alteraciones cromosómicas

Las alteraciones cromosómicas son de dos clases: 1. Alteraciones numéricas y 2. Aberraciones de la estructura.

Alteraciones numéricas

Las alteraciones en el número cromosómico de las células pueden originarse como resultado del fenómeno denominado *no disyunción o no separación cromosómica*, de *un rezago anafásico* en la migración de los cromosomas hacia los polos celulares o por cambios en el número de cromosomas de los gametos que implican la repetición de varios conjuntos (*sets*) haploides de cromosomas.

Las fallas pueden originarse en la división de meiosis, tanto en la primera como en la segunda división de meiosis o en ambas, o presentarse durante la división de tipo mitótico.

Cuando los cambios en el número de cromosomas conducen a la presencia de un número que es múltiplo exacto del número haploide, se habla de *euploidía*, pero cuando sólo uno o algunos cromosomas están involucrados, a la alteración numérica se le denomina *aneuploidía*.

Una célula que contenga más de dos conjuntos haploides de cromosomas recibe, en términos generales, el nombre de *poliploide*. La poliploidía es especialmente común en las plantas fanerógamas y no es tan frecuente en los recién nacidos, pero constituye un importante componente de los abortos espontáneos. Como ya se mencionó, la célula diploide tienen dos conjuntos cromosómicos (46), la triploide tres (69) y la tetraploide cuatro (92).

Las aneuploidías se presentan porque uno de los cromosomas, junto con su homólogo, pasa al mismo polo de la célula o se incorpora al mismo gameto. A este fenómeno se le conoce como no disyunción o no separación cromosómica (figura 27-11). Si el gameto que lleva un cromosoma adicional se une con uno normal, originará un individuo *trisómico* (2n+1). Cuando la fecundación implica la fusión de un gameto normal con uno al que le falta un cromosoma, se formará un sujeto *monosómico* (2n−1).

Las aneuploidías son causa muy importante de malformaciones congénitas al nacimiento. Las fallas de la división celular pueden presentarse en la meiosis I o en la meiosis II (figura 27-12), por supuesto en la espermatogénesis o en la ovogénesis, y también pueden ocurrir en la mitosis en las divisiones tempranas del cigoto (figura 27-13).

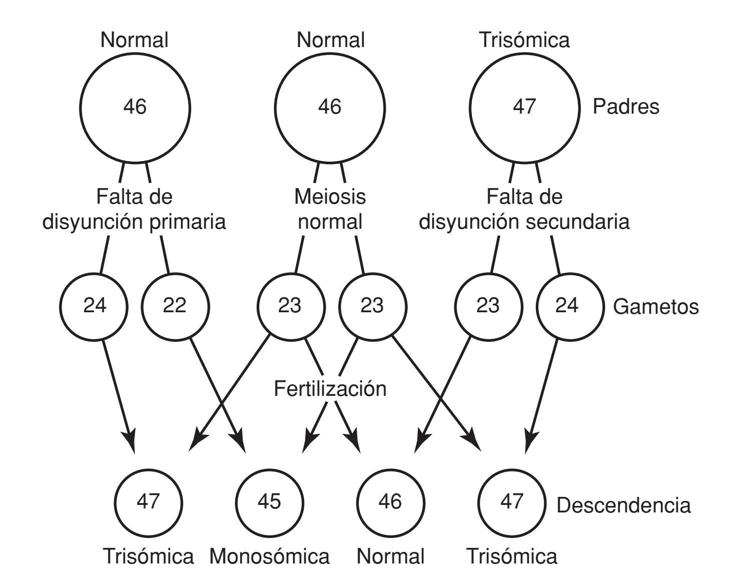


Figura 27-11. Aneuploidía por no separación o no disyunción cromosómica. Formación de sujetos trisómicos o monosómicos.

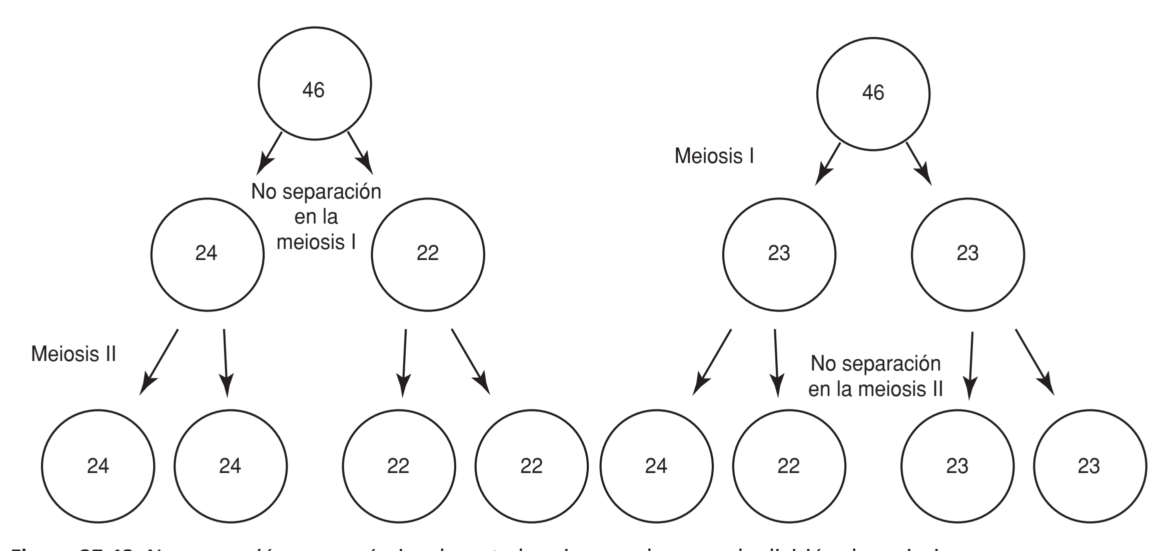


Figura 27-12. No separación cromosómica durante la primera o la segunda división de meiosis.

Son ejemplos de aneuploidías el síndrome de Down o trisomía 21 (cariotipo 47,XY o XX, + 21); el síndrome de Turner o monosomía de un gonosoma (cariotipo 45,X); doble trisomía, cuando se encuentran dos cromosomas adicionales de distinto par como en una paciente que tenga síndrome de Down y además presente tres cromosomas X (cariotipo 48,XXX,+21); tetrasomía cuando los dos cromosomas adicionales son del mismo par como en el cariotipo 48,XXXX.

Cuando la no separación cromosómica se produce en la mitosis temprana, después de la formación del cigoto (falla poscigótica), durante la formación de las primeras blastómeras, se originan los *mosaicos* o *mixoploidías* (figura 27-13). El tipo y número de células aneuploides que se formen depende del momento en el que ocurra la no separación poscigótica.

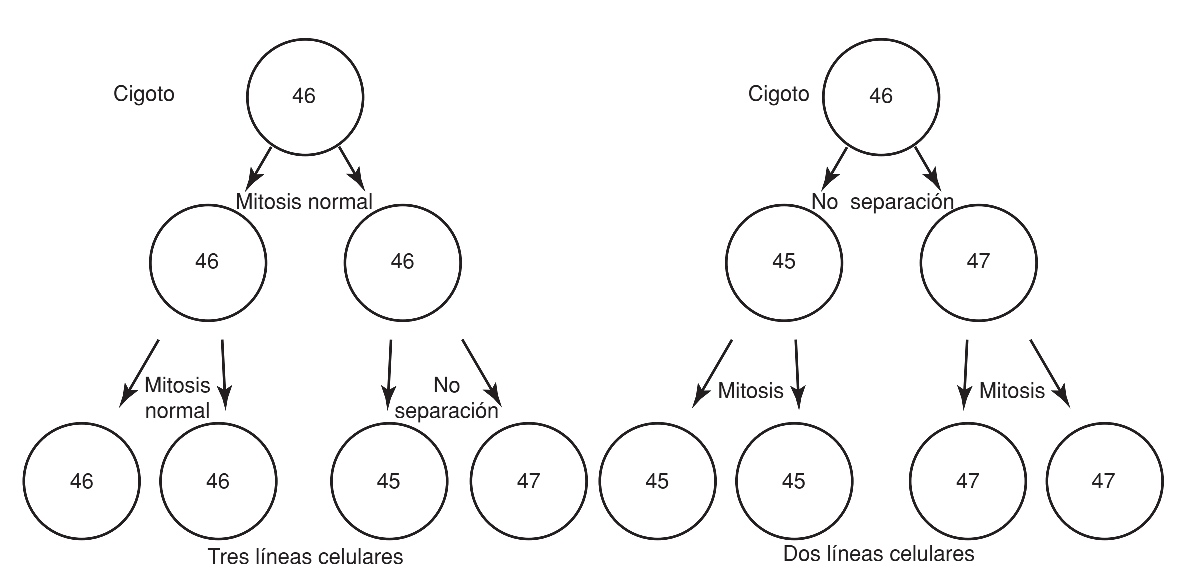


Figura 27-13. Origen de los mosaicos o mixoploidías por no disyunción después de la formación del cigoto.

No todas las líneas celulares que se forman como resultado de la no separación cromosómica son viables, ya que algunas quedan sin la información genética necesaria para seguir multiplicándose y desaparecen. De hecho, aproximadamente la mitad de los abortos espontáneos del primer trimestre de la gestación se deben a una alteración numérica o estructural de los cromosomas. Así, las monosomías autosómicas no son viables y algunas trisomías, como la del cromosoma número 16, se encuentran frecuentemente en los productos abortados. La monosomía del cromosoma X (síndrome de Turner) es viable, pero la mayoría de los cigotos X0 son abortados tempranamente.

Alteraciones en la estructura

Los cromosomas están expuestos a la acción de numerosos agentes ambientales mutagénicos que los dañan y les ocasionan fracturas o rompimientos. Estos agentes pueden ser de naturaleza física como las radiaciones, química como drogas y agentes alquilantes, o biológicos como los virus. Existen mecanismos de reparación celular que tratan de subsanar el daño, pero éste puede ser tan grave, o los mecanismos de reparación no ser tan eficientes, que se produzcan las alteraciones estructurales (figura 27-14).

> Los cromosomas están expuestos a la acción de numerosos agentes ambientales mutagénicos que los dañan y les ocasionan fracturas o rompimientos.

Si un cromosoma pierde un segmento de su estructura, se dice que tiene una *deleción* o *pérdida* de material genético. La deleción puede ser terminar o intercalar; cuando la deleción ocurre en los dos extremos del cromosoma, la porción que porta el centrómero une sus extremos rotos y forma una estructura circular o cromosoma en *anillo*. Se dice que hay *duplicación* cuando un segmento o una misma secuencia de genes aparece en forma doble en el mismo cromosoma. Se produce una *inversión* cuando un seg-

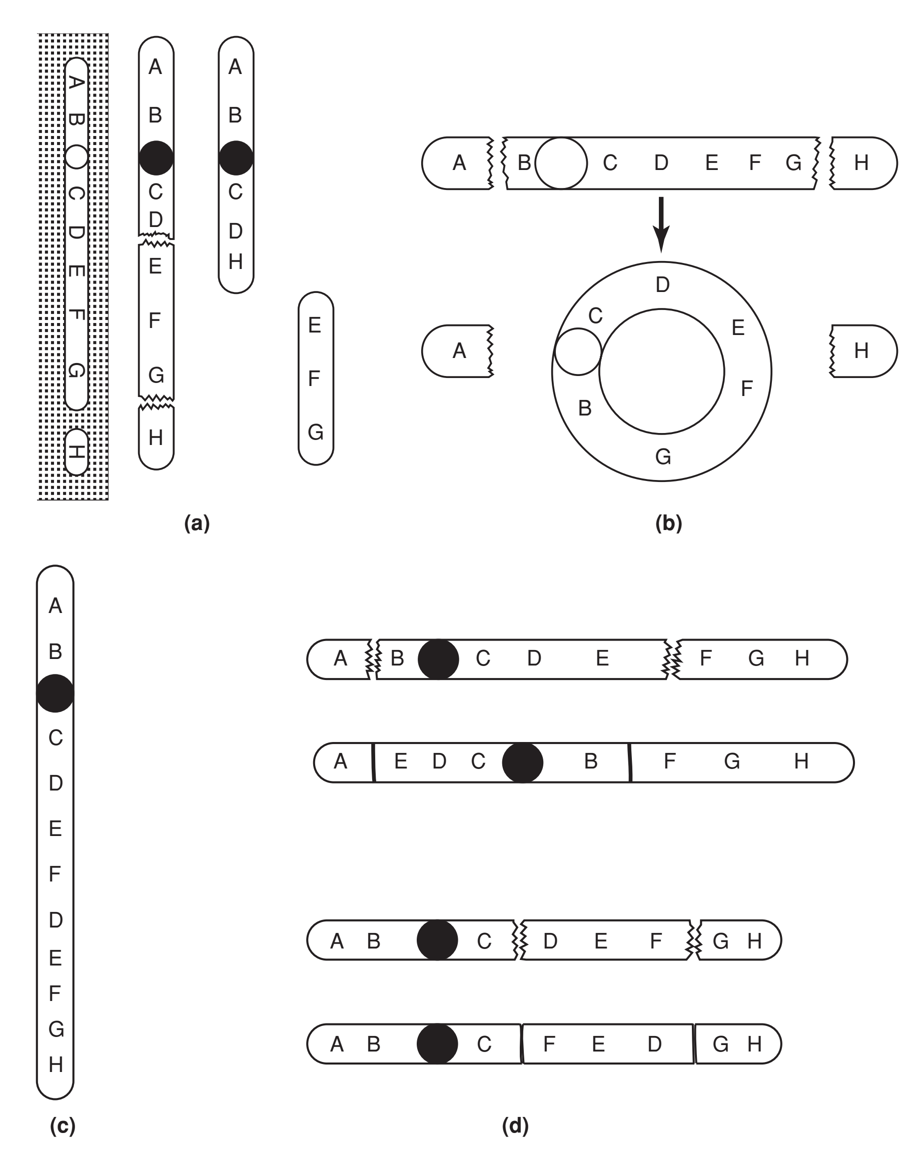


Figura 27-14. a) Deleción terminal o intercalar; **b)** formación de los anillos; **c)** duplicación cromosómica; **d)** inversiones pericéntricas y paracéntricas.

mento cromosómico rota 180° sobre sí mismo y se coloca nuevamente en el cromosoma, pero en forma invertida, quedando la secuencia de genes alterada. La inversión puede ser *paracéntrica*, si el segmento invertido no incluye el centrómero, o *pericéntrica*, si el centrómero queda incluido.

Se denomina *translocación* al intercambio de segmentos entre cromosomas.

Se denomina *translocación* al intercambio de segmentos entre cromosomas. La translocación puede ser recíproca o no, y puede involucrar cromosomas homólogos o no homólogos. Un tipo especial de translocación es la fusión céntrica o robertsoniana que ocurre entre cromosomas acrocéntricos (figura. 27-15), la cual ha desempeñado un importante papel en la evolución, al permitir la reducción del número cromosómico en las especies.

Durante la meiosis, los cromosomas involucrados también se aparean, pero en vez de formar bivalentes, que son normales, forman cuadrivalentes. El cuadrivalente puede segregar en las formas siguientes (figura 27-16):

a) Segregación alterna: cuando los centrómeros alternos (de cromosomas no homólogos) segregan al mismo polo, por consiguiente pasan al mismo gameto.

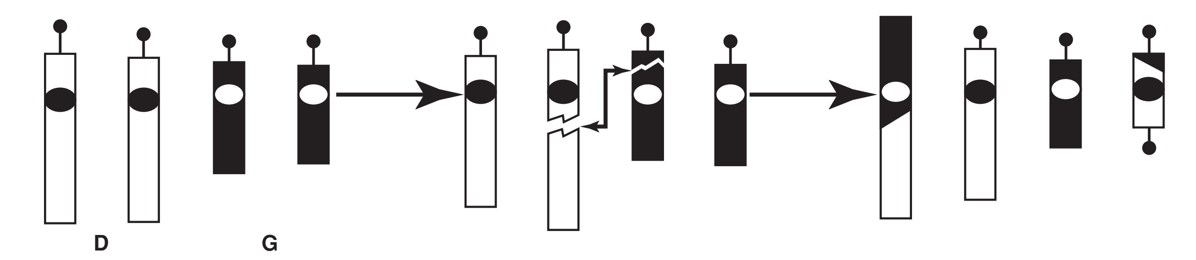
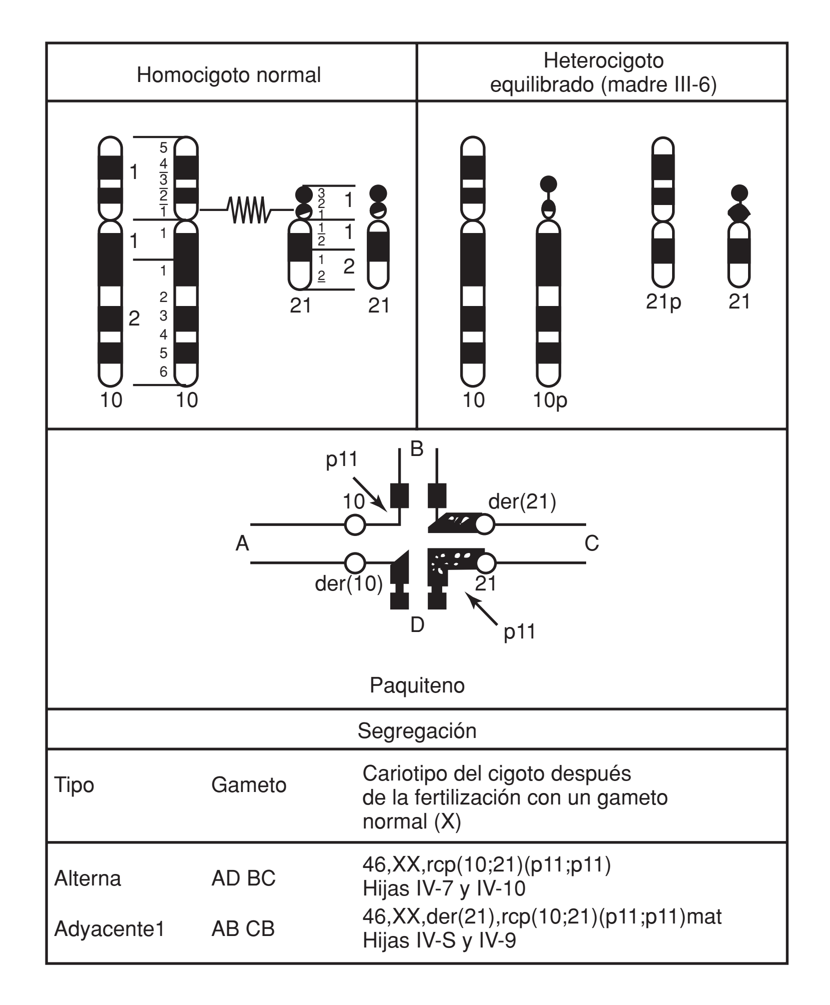


Figura 27-15. Formación de una translocación robertsoniana. Designarse así a la que ocurre entre cromosomas acrométricos.



Segregación		
Tipo	Gameto	Cariotipo del cigoto después de la fertilización con un gameto normal (X)
Alterna	AD BC	46,XX,rcp(10;21)(p11;p11) Hijas IV-7 y IV-10
Adyacente1	AB CB	46,XX,der(21),rcp(10;21)(p11;p11)mat Hijas IV-S y IV-9

Figura 27-16. Segregación de un cuadrivalente en una translocación equilibrada.

b) Adyacente 1: los cromosomas adyacentes con centrómeros no homólogos segregan al mismo gameto.
c) Adyacente 2: los cromosomas adyacentes con centrómeros homólogos pasan al mismo gameto.

Como resultado de la segregación alterna, un gameto será normal y el complementario portará la translocación en forma equilibrada, mientras que las segregaciones adyacentes originarán gametos no equilibrados con deficiencias (monosomías) y duplicaciones (trisomías).

Las translocaciones robertsonianas, como ya se mencionó, involucran cromosomas acrocéntricos y constituyen una de las causas del síndrome de Down. Por esta razón, reviste interés contemplar la segregación en el caso de una persona portadora de una translocación heteróloga 14/21 (figura 27-17). Se pueden formar seis clases de gametos que podrán originar los siguientes productos:

1. monosómicos para el cromosoma 14;
2. monosómicos para el cromosoma 21;
3. trisómicos para el cromosoma 14;
4. trisómicos para el cromosoma 21;
5. normales;
6. portadores de translocación 14/21.

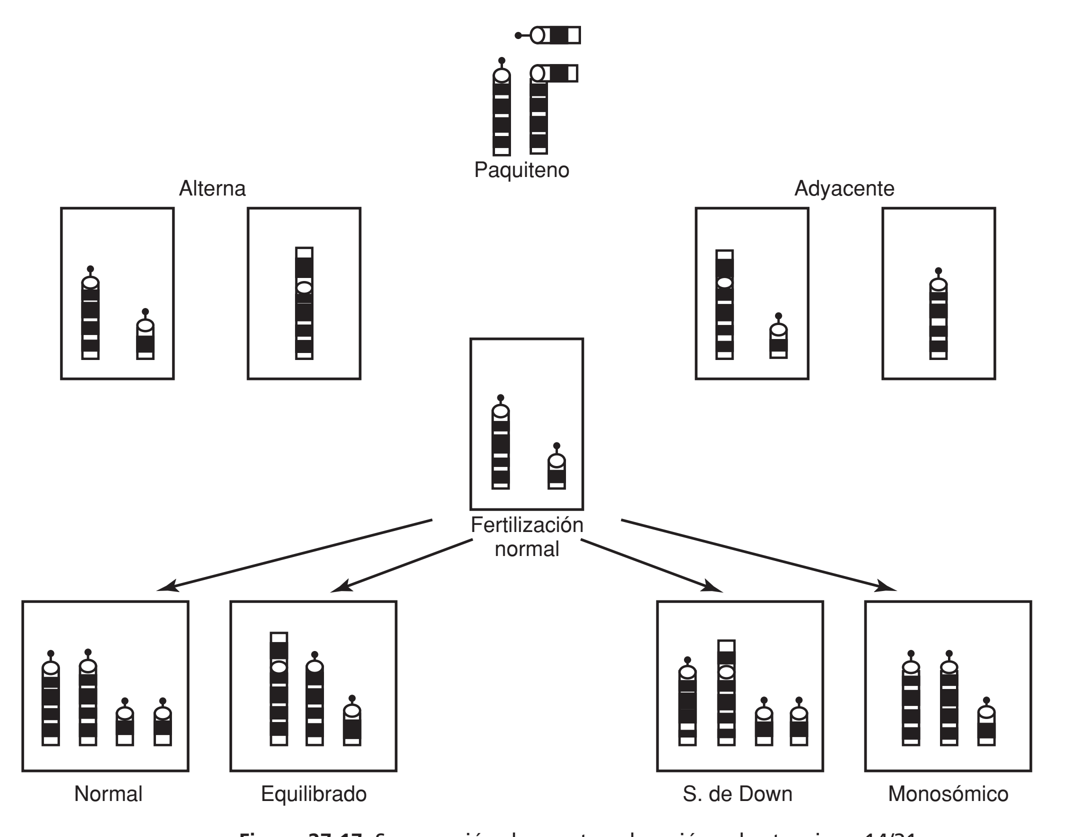


Figura 27-17. Segragación de una translocación robertsoniana 14/21.

Los tres primeros son abortados tempranamente, por lo que las familias con estos problemas suelen consultar por aborto repetido o aborto habitual. Los productos trisómicos 21 tienen síndrome de Down y esto explica el riesgo de presentar esta alteración cromosómica cuando cualquiera de los cónyuges es portador de una translocación que involucre al cromosoma 21. Los hijos fenotípicamente (clínicamente) sanos de una pareja en tales circunstancias, deben ser estudiados con cariotipo porque pueden corresponder a sujetos cromosómicamente normales o a individuos equilibrados que, por supuesto, en la etapa reproductiva tendrán a su vez riesgo de descendencia anormal.

Otras alteraciones estructurales son el *isocromosoma* y el cromosoma *dicéntrico*. El isocromosoma se forma cuando el centrómero, en vez de dividirse longitudinalmente, lo hace en forma transversal, pudiéndose originar un isocromosoma de brazos cortos o un isocromosoma de brazos largos (figura 27-18). El cromosoma dicéntrico (figura 27-19) es aquel que tiene dos centrómeros y que presenta, por lo mismo, un comportamiento especial en la meiosis, ya que se originan puentes de tensión en la anafase cuando cada centrómero tiende a migrar a un polo diferente.

El Proyecto del Genoma Humano, iniciado en el año de 1990, tiene como objetivo fundamental establecer la secuencia de los 3,500 millones de bases nitrogenadas que constituyen nuestro genoma haploide y reconocer la ubicación que los genes tienen a lo largo de la estructura cromosómica.



El Proyecto del Genoma Humano y la localización de genes en los cromosomas

El Proyecto del Genoma Humano, iniciado en el año de 1990, tiene como objetivo fundamental establecer la secuencia de los 3,500 millones de bases

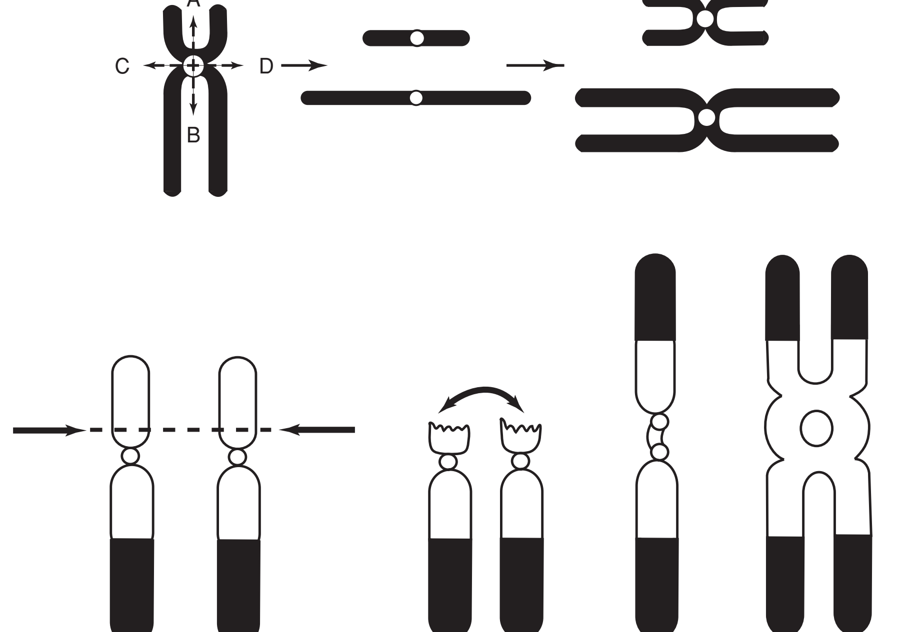


Figura 27-18. Mecanismo de formación de un isocrosoma por división anormal del centrómero.

Figura 27-19. Formación de un cromosoma dicéntrico por translocación de cromátidas.

nitrogenadas que constituyen nuestro genoma haploide y reconocer la ubicación que los genes tienen a lo largo de la estructura cromosómica.

Este proyecto ha alcanzado antes del plazo inicialmente previsto una meta trascendental al publicarse en las prestigiosas revistas internacionales *Nature* y *Science* el primer borrador de la secuencia del genoma humano. Este avance se logra apenas un año después de conocer la secuencia del cromosoma número 22, el primer cromosoma humano secuenciado, sólo meses después de la secuenciación del cromosoma 21 y de la publicación de la secuencia del genoma de la *Drosophila melanogaster*.

El intento de hacer una publicación conjunta con la participación, a mediados del año anterior, de los gobiernos de Estados Unidos y del Reino Unido, no fructificó. Por esta razón el Consorcio Público del Genoma que ha mantenido una política abierta de colaboración internacional y un principio de liberación rápida y no restringida de los datos de las secuencias que se van generando, decidió publicar sus resultados en la revista *Nature* y hacerlos disponibles en la Internet.

Por el otro lado, el consorcio privado que intenta obtener patentes de los genes humanos envió, y fue aceptado, para sorpresa de buena parte de la comunidad científica, su artículo a la revista *Science*. En este caso, por supuesto, la información que se considera más rentable, desde el punto de vista de su comercialización futura, no es liberada en la Internet.

Más allá de la polémica que estas dos posturas antagónicas han generado, es incuestionable que estos logros revolucionarán a mediano plazo el ejercicio profesional médico. Se ampliará el inventario de los genes que implican susceptibilidad a las neoplasias y se podrá discernir mejor la interacción con factores ambientales mutagénicos y carcinogénicos; se llevará a cabo cada vez con mayor frecuencia el diagnóstico presintomático de las enfermedades hereditarias, reconociendo con mucha anticipación al cuadro florido de las manifestaciones clínicas a quienes han recibido el gen anormal; se ampliará considerablemente el horizonte de las pruebas diagnósticas prenatales en aquellas parejas en riesgo de tener un producto afectado con un grave padecimiento genético; se estará en posibilidad de ejercer una medicina completamente individualizada al administrar el medicamento adecuado, en las dosis óptimas según el genoma y, por lo mismo, el metabolismo de cada paciente, y se podrá contar para un número cada vez mayor de padecimientos con los recursos prometedores que ofrecen la terapia génica y la terapia de las células troncales.

> Estamos ahora ante los pasos iniciales de la medicina genómica, pero su futuro es muy promisorio.

> El número de genes humanos apenas llega a 30,000, por lo que el reto consiste en dilucidar el funcionamiento y regulación de los mismos y la muy compleja interacción de las proteínas en lo que ya se ha denominado como la "*proteómica*".

Estamos ahora ante los pasos iniciales de la medicina genómica, pero su futuro es muy promisorio: la secuencia del genoma ha establecido, contra lo que se esperaba, que el número de genes humanos apenas llega a 30,000, por lo que el reto consiste en dilucidar el funcionamiento y regulación de los mismos y la muy compleja interacción de las proteínas en lo que ya se ha denominado como la "*proteómica*". Las aplicaciones que se derivan de este conocimiento no están, por supuesto, a la vuelta de la esquina, pero el notable avance que significa contar con la secuencia del genoma los hace cada vez más factibles y cercanos.

No puede perderse de vista que estos desarrollos tienen muy importantes implicaciones éticas, legales y sociales. Considérese, por ejemplo, el diagnós-

tico presintomático de enfermedades gravemente limitantes para las cuales todavía no hay tratamiento, como las enfermedades de Huntington y la de Alzheimer, las cuales, además, clásicamente se manifiestan en la edad adulta.

En nuestro país, y en general en los países latinoamericanos, los gobiernos y los sistemas de investigación, de educación y salud, deben destinar mayores recursos para el desarrollo de la ciencia y la medicina genómica y proteómica. Debe apoyarse la investigación en este campo, actualizar los programas de genética y bioética tanto a nivel de bachillerato como de licenciatura, ampliar los programas de formación de recursos humanos de alto nivel y desarrollar una ambiciosa tarea de educación y difusión en la población general.

Han transcurrido casi cinco decenios desde el significativo hallazgo de Watson y Crick, que permitió una revolución en la biología contemporánea. En este lapso el desarrollo de la genética humana ha sido impresionante: en la décima edición del catálogo de McKusick se incluyen cerca de 6,000 padecimientos que se transmiten con patrón de herencia mendeliano simple y mediante las técnicas de bandas citogenéticas y de hibridización *in situ,* conocidas como FISH (*fluorescence in situ hybridization*) se conocen en la actualidad más de 500 síndromes de etiología cromosómica.

Los logros más impresionantes, sin embargo, se han alcanzado gracias al portentoso desarrollo de las técnicas de ingeniería genética, mediante el empleo de las enzimas de restricción, y más recientemente a las innovadoras metodologías de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la amplificación enzimática de segmentos específicos del DNA y, por lo mismo, la obtención de millones de copias del segmento génico en un tiempo relativamente breve, así como el empleo de cromosomas artificiales de levadura, conocidos como YAC (por sus siglas en inglés: *yeast artificial chromosomes*) y de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) para la manipulación genética.

La interrelación de estos avances ha permitido alcanzar la era de la citogenética molecular y se ha superado actualmente la cifra de 3,000 genes localizados en los cromosomas humanos, como se tratará más adelante, lo que hace posible el diagnóstico de los portadores de genes autosómicos recesivos, de las portadoras de genes ligados al cromosoma X, el diagnóstico prenatal de estas entidades, lo que ha cambiado radicalmente el asesoramiento genético, al permitir el diagnóstico *in utero* de los padecimientos hereditarios, incluyendo algunos de los que se manifiestan en forma tardía en el adulto, tales como la enfermedad de Huntington, la distrofia miotónica y el riñón poliquístico.

Se ha superado actualmente la cifra de 3,000 genes localizados en los cromosomas humanos.

Los avances no se limitan a estas aplicaciones en el campo preventivo, sino que también se han alcanzado logros espectaculares desde el punto de vista terapéutico, como ocurre en padecimientos tan importantes por su frecuencia y por sus manifestaciones clínicas como la fibrosis quística y la distrofia muscular de Duchenne.

Estos desarrollos, por otra parte, han permitido poner en marcha el proyecto más ambicioso de toda la historia de la investigación biomédica: alcanzar la secuenciación completa de los 3,500 millones de bases nitroge-

nadas del DNA humano y conocer su ordenamiento a lo largo de cada uno de nuestros cromosomas, lo que se conoce, como ya se mencionó, como el Proyecto del Genoma Humano.

Genética molecular

El campo de la genética molecular abarca el conocimiento de la estructura y función de los ácidos nucleicos, los mecanismos de la traducción, la regulación de la síntesis proteica, los cambios o modificaciones en el DNA, lo que constituye las denominadas mutaciones y los mecanismos de la reparación del daño celular.

Un desarrollo fundamental de la genética molecular consiste en identificar la naturaleza precisa de la mutación que afecta a los genes responsables de patología hereditaria en el humano. Mediante este conocimiento es posible hacer un diagnóstico preciso de la enfermedad al examinar el DNA de cualquier célula del organismo.

Los genes están distribuidos a lo largo de 23 pares de cromosomas homólogos, ocupando un lugar o *locus* específico. Los dos genes que ocupan los mismos lugares en los cromosomas homólogos se denominan *alelos*.

Los genes están distribuidos a lo largo de 23 pares de cromosomas homólogos, ocupando un lugar o *locus* específico. Los dos genes que ocupan los mismos lugares en los cromosomas homólogos se denominan *alelos*. Existen genes dominantes o recesivos, según se manifiesten fenotípicamente, cuando el individuo es heterocigoto (los dos alelos difieren entre sí), u homocigoto, en cuyo caso los dos alelos son iguales. Los genes que se expresan cuando el individuo es heterocigoto son los dominantes y los que lo hacen cuando el sujeto es homocigoto son los recesivos.

De los 23 pares de cromosomas, 22 son comunes al varón y a la mujer, y se llaman autosomas, y el par que resta es XX en la mujer y XY en el varón, ya que este último cromosoma porta el gen SRY responsable de la diferenciación testicular en el humano. Como los genes pueden estar localizados en los autosomas o en los cromosomas sexuales o gonosomas X y Y, existen cuatro principales patrones de herencia mendeliano: autosómico dominante, autosómico recesivo, ligado al X dominante y ligado al X recesivo.

Existen aproximadamente 30,000 genes en cada una de nuestras células, pero en cada una sólo son activos o funcionan aproximadamente la tercera parte de ellos para mantener su viabilidad y sus funciones especializadas.

Existen aproximadamente 30,000 genes en cada una de nuestras células, pero en cada una sólo son activos o funcionan aproximadamente la tercera parte de ellos para mantener su viabilidad y sus funciones especializadas. No se sabe por qué los genes están ubicados en sitios particulares del genoma y en un cromosoma en particular. Algunos de ellos se agrupan en cortas regiones como sucede con los genes que codifican para las cadenas alfa de la hemoglobina en el cromosoma 16, los que codifican para las cadenas beta localizados en el brazo corto del cromosoma 11.

Sólo una pequeña porción del DNA, aproximadamente el 10% del total, corresponde al que codifica para los genes.

Un hallazgo sorprendente de la genética molecular es que sólo una pequeña porción del DNA, aproximadamente el 10% del total, corresponde al que codifica para los genes. La mayor parte no tiene una función precisa y consta de secuencias que se repiten desde unas pocas hasta un millón de veces en el genoma. Dentro de estas secuencias repetidas se encuentran las secuencias Alu que constan de 300 pares de bases nitrogenadas que alcanzan medio millón de copias en el genoma.

El material genético de la célula no sólo se encuentra en los cromosomas del núcleo. Las mitocondrias, que están en el citoplasma, cuentan con un DNA circular (mtDNA), que tiene 16,254 pares de bases. Existe importante patología en el humano que se debe a mutaciones en el mtDNA, tales como la atrofia óptica de Leber, el síndrome de Kearns-Sagre, numerosas miocardiopatías y encefalomiopatías con trastornos convulsivos.

El material genético de la célula no sólo se encuentra en los cromosomas del núcleo. Las mitocondrias, que están en el citoplasma, cuentan con un DNA circular (mtDNA), que tiene 16,254 pares de bases.

Como las mitocondrias sólo se heredan por rama materna, ya que todas provienen del óvulo porque el espermatozoide no aporta mitocondrias, estos padecimientos se transmiten sólo por rama materna. Esta característica y la aplicación de las técnicas de genética molecular han permitido realizar investigaciones encaminadas a precisar el origen de nuestro primer ancestro femenino, lo que constituye una verdadera búsqueda de Eva, y se ha logrado trazar un árbol evolutivo que culmina en una mujer que vivió hace 200,000 años en el África. En forma paralela, el estudio molecular del cromosoma Y, que por supuesto sólo se transmite de padre a hijo, permitirá establecer una genealogía que conduzca a Adán.

Las mitocondrias sólo se heredan por rama materna, ya que todas provienen del óvulo porque el espermatozoide no aporta mitocondrias.



Patología genética

Las alteraciones genéticas pueden producirse por mutaciones en los genes, por cambios en el número o en la estructura cromosómica o por la interacción de factores de susceptibilidad genética con factores ambientales que condicionan los padecimientos poligénicos o multifactoriales. Los primeros corresponden a las entidades mendelianas simples como la fibrosis quística, la fenilcetonuria, las mucopolisacaridosis; los segundos, a las cromosomopatías, tales como el síndrome de Down (trisomía 21), el síndrome de Turner (45,X) o el síndrome de Klinefelter (47,XXY); y los últimos, a los trastornos poligénicos o multifactoriales que comprenden las malformaciones congénitas comunes como el labio y paladar hendido, la estenosis congénita del píloro, las malformaciones cardiacas congénitas, el pie equino varo, la displasia congénita de cadera, los defectos de cierre del tubo neural (anencefalia, mielomeningocele, espina bífida) y enfermedades sistémicas como la diabetes, la enfermedad isquémica del miocardio, la hipertensión arterial, las enfermedades autoinmunes y la esquizofrenia. En cada una de estas categorías la genética molecular ha permitido notables avances.

Las alteraciones genéticas pueden producirse por mutaciones en los genes, por cambios en el número o en la estructura cromosómica o por la interacción de factores de susceptibilidad genética con factores ambientales que condicionan los padecimientos poligénicos o multifactoriales.

Con relación a los padecimientos mendelianos (tabla 27-1) se incluye la localización cromosómica de los genes responsables de padecimientos de interés en medicina. Aparecen ordenados según el cromosoma involucrado, su localización en el brazo corto (p) o en el brazo largo (q), el gen alterado, y la enfermedad correspondiente.

En este mapa mórbido resaltan las localizaciones de padecimientos autosómicos recesivos como el síndrome de Hurler en el cromosoma 4, la argininemia en el cromosoma 6, la fibrosis quística en el cromosoma 7, la galactosemia en el cromosoma 9, la anemia de células falciformes, las betatalasemias y la ataxia-telangiectasia en el cromosoma 11, la fenilcetonuria en el cromosoma 12, la deficiencia de alfa-1-antitripsina en el cro-

Tabla 27-1. Localización cromosómica de algunos genes responsables de patología en el humano.

Padecimiento	Gen afectado	Localización
Neuroblastoma	Supresor	1p36
Eliptocitosis	Proteína 4.1	1p36
Eritroblastosis fetal	RH	1p36
Hipofosfatasia infantil	Fosfatasa alcalina	1p36
Fucosidosis	Fucosidasa	1p34
Alzheimer	Presenilina 2	1q21
Enfermedad de Gaucher	Glucosidasa beta	1q21
Crigler-Najjar	Bilirrubina UDPG	1q21
Charcot-Marie Tooth	Conducción nerviosa	1q21
Van der Woude	Labio y paladar hendido	1q32
Aniridia-1	Aniridia-1	2p25
Ehlers-Danlos IV	Alfa 1, colágeno III	2q31
Rabdomiosarcoma	RMSA alveolar	2q37
Waardenburg	Gene homeótico-3	2q37
Von-Hippel-Lindau	Supresor	3p26
Epidermólisis bulosa	Alfa 1, colágeno VII	3p21
Gangliosidosis GM-1	Galactosidasa beta 1	3p21
Oroticaciduria	Orotato PRT	3q13
Atransferrinemia	Transferrina	3q21
Acidemia propiónica	Propionil- CoA-carboxilasa	3q21
Corea de Huntington	Tripletas repetidas	4p16
Síndrome de Hurler	Alfa-L-irudonidasa	4p16
Dentinogénesis imperfecta	DGI-1	4q13
Disfibrinogenemias	Fibrinógeno	4q28
Enanismo de Laron	Receptor hormona crecimiento	5p13
Maroteaux-Lamy	Arilsulfatasa B	5q11
Enfermedad de Sandhoff	Hexosaminidasa B	5q13
Treacher-Collins	Disostosis	5q31
Esquizofrenia	Comportamiento	5q31
Deficiencia de factor XII	Factor de Hageman	5q33
Labio-paladar hendido	Labio y paladar	6p23
Deficiencia de factor XIII	Polipéptido A factor XIII	6p25
Orina en jarabe de arce	Tipo 3	6p22
Defecto septal atrial	Tipo *secundum*	6p21
Deficiencia de complemento	Factores complemento	6p21
Hiperplasia suprarrenal	21-Hidroxilasa	6p21
Hemocromatosis	Hemocromatosis	6p21
Diabetes insulinodependiente	Ligada a HLA	6p21
Retinitis pigmentosa	Degeneración retiniana	6p21
Esquizofrenia	Comportamiento	6p21
Argininemia	Arginasa	6q23
Craneosinostosis	Craneosinostosis	7p21
Aciduria argininosuccínica	Argininosuccinato-liasa	7q11
Síndrome de Zellweger	Zellweger	7q11
Mucopolisacaridosis VII	Beta-glucuronidasa	7q21
Osteogénesis imperfecta	Cadena alfa-2, colágena I	7q21
Fibrosis quística	Regulador conductasa transmembranal	7q31
Holoprosencefalia	Tipo 3	7q36
Trombofilia	Activador de plasminógeno	8p12
Acidosis tubular renal	Anhidrasa carbónica	8q22
Epidermólisis bulosa	Simple 1 (Ogna)	8q24
Langer-Giedion	Langer-Giedion	8q24
Hipotiroidismo congénito	Tiroglobulina	8q24
Galactosemia	Galactosa-1-P-uridiltransferasa	9p13
Intolerancia a fructuosa	Aldolasa B	9q22
Esclerosis tuberosa	Tipo 1	9q33

Tabla 27-1. Continuación

Padecimiento	Gen afectado	Localización
Citrulinemia	Argininosuccinato-sintetasa	9q34
Leucemia mieloide crónica	Oncogén ABL	9q34
Glioblastoma multiforme	Glioblastoma	10p12
Porfiria congénita	Uroporfirinógeno III	10q25
Atrophia gyrata	Ornitina aminotransferasa	10q26
Wiedeman-Beckwith	Wiedemann-Beckwith	11p15
Anemia de células falciformes	Betaglobina	11p15
Talasemia	Betaglobina	11p15
Diabetes mellitus	Insulina	11p15
QT prolongado	Romano-Ward	11p15
Nefroblastoma	Tumor de Wilms-2	11p15
Niemann-Pick	Esfingomielinasa	11p15
Nefroblastoma	Tumor de Wilms-1	11p13
Psicosis	Comportamiento	11p13
Albinismo	Tirosinasa	11q14
Ataxia-telangiectasia	Ataxia-telangiectasia	11q22
Enf. coronaria prematura	Apolipoproteína	11q23
Porfiria aguda intermitente	Porfobilinógeno-deaminasa	11q24
Von Willebrand	Factor de Von Willebrand	12p12
Raquitismo resistente	Vitamina D	12q12
Fenilcetonuria	Fenilalanina-hidroxilasa	12q24
Cáncer de mama	BRCA2	13q12
Retinoblastoma	Supresor	13q14
Deficiencia de factor VII	Factor VII	13q34
Deficiencia de factor X	Factor X	13q34
Alzheimer	Presenilina	14q24
Porphiria variegata	Protoporfirinógeno	14q32
Deficiencia de alfa-1-antitripsina	Alfa-1-antitripsina	14q32
Prader-Willi	Prader-Willi	15q11
Angelman	Angelman	15q11
Marfan	Fibrilina-1	15q21
Tay-Sachs	Hexosaminidasa A	15q23
Talasemia	Alfaglobina	16p13
Riñón poliquístico	Riñón poliquístico	16p13
Tirosinemia II	Tirosina aminotransferasa	16q22
Enf. de Norum	Lecitincolesterol	16q22
Miller-Dicker	Lisencefalia	17p13
Li-Fraumeni	Supresor p53	17p13
Pseudohermafroditismo	Estradiol-17-beta	17q11
Neurofibromatosis	Von Recklinhausen	17q11
Osteogénesis imperfecta	Alfa-1, colágena I	17q11
Cáncer de mama	BRCA1	17q21
Trombastenia de Glanzmann	Integrina	17q21
Enf. de Pompe	Glucosidasa alfa	17q23
Protoporfiria eritropoyética	Ferroquellatasa	18q21
Psicosis	Comportamiento	18q21
Gilles de la Tourette	Gilles de la Tourette	18q22
Persistencia de conductos müllerianos	Hormona anti-Müller	19p13
Leprechaunismo	Receptor insulina	19p13
Hipercolesterolemia familiar	Receptor LDL	19p13
Manosidosis	Alfa-D-manosidasa	19p13
Dislipoproteinemia	Apolipoproteína	19q13
Alzheimer	Apolipoproteína	19q13
Hipertermia maligna	Canal de calcio	19q13

(*continúa*)

Tabla 27-1. Continuación

Padecimiento	Gen afectado	Localización
Orina en jarabe de arce	Ceto-ácido-deshidrogenasa	19q13
Distrofia miotónica	Tripletas repetidas	19q13
Diabetes insípida	Vasopresina	20p12
Creutzfeldt-Jakob	Prión	20p12
Anemia de Fanconi	Anemia de Fanconi	20q11
Inmunodeficiencia importante	Adenosina-deaminasa	20q13
Alzheimer	Betaamiloide	21q21
Homocistinuria	Cistation-sintetasa	21q22
DiGeorge	DiGeorge	22q11
Ojo de gato	Ojo de gato	22q11
Leucemia mieloide crónica	BCR	22q11
Meningioma	Meningioma	22q12
Esquizofrenia	Comportamiento	22q12
Ictiosis	Arilsulfatasa	Xp22
Chondrodysplasia punctata	Condrodisplasia	Xp22
Kallman	Kallman	Xp22
Distrofia de Duchenne	Distrofina	Xp21
Def. ornitina-transcarbamilasa	Ornitina-transcarbamilasa	Xp21
Enf. de Norrie	Norrie	Xp11
Retinitis pigmentosa	Tipo 2	Xp11
Wiscott-Aldrich	Wiskott-Aldrich	Xp11
Feminización testicular	Receptor de andrógenos	Xq11
Enf. de Menkes	Menkes	Xq12
Displasia ectodérmica	Displasia ectodérmica	Xq12
Aarskog-Scott	Aarskog-Scott	Xq13
Enf. de Fabry	Galactosidasa alfa	Xq22
Lesch-Nyhan	HGPRT	Xq26
Hemofilia B	Factor IX	Xq26
X-frágil	Tripletes repetidos	Xq27
Hemofilia A	Factor VIII	Xq28
Ceguera al color	Deutan	Xq28
Hunter	Sulfoirudonato-sulfatasa	Xq28
Disgenesia gonadal	SRY	Yp11
Hermafroditismo	SRY	Yp11
Azoospermia	Factor AZF	Yq11

mosoma 14, la enfermedad de Tay-Sachs en el cromosoma 15, la manosidosis en el cromosoma 19, la anemia de Fanconi y la inmunodeficiencia grave en el cromosoma 20, la homocistinuria en el 21 y el síndrome de DiGeorge en el 22.

Con relación a los padecimientos dominantes, el síndrome de Van der Woude en el cromosoma 1, el síndrome de Waardenburg en el cromosoma 2, la corea de Huntington en el 4, genes de osteogénesis imperfecta en el cromosoma 7 y en el 17, la esclerosis tuberosa en el cromosoma 9, la enfermedad de Von Willebrand en el 12, el síndrome de Marfan en el cromosoma 15, la neurofibromatosis en el 17, la hipercolesterolemia familiar en el 19 y la enfermedad de Alzheimer, para la cual existe notable heterogeneidad genética, ya que hay genes relacionados con este padecimiento localizados en el cromosoma 1, en el cromosoma 14, en el cromosoma 19 y en el cromosoma 21.

Hay que destacar también la localización de genes que implican susceptibilidad a los tumores y que corresponden a genes supresores o antioncogenes, como los involucrados en las neoplasias embrionarias el gen del neuroblastoma en el cromosoma 1, el del nefroblastoma o tumor de Willms en el cromosoma 11 y el del retinoblastoma en el cromosoma 13. También aquellos genes que implican susceptibilidad a cáncer de mama como p53 en el cromosoma 17, BRCA1 también en este cromosoma y BRCA2 en el cromosoma 13.

También cabe destacar la identificación de genes de susceptibilidad a graves trastornos del comportamiento como los relacionados con la esquizofrenia y la psicosis maniacodepresiva, localizados en distintos cromosomas humanos.

Con relación a las fallas de la diferenciación sexual, ya fueron mencionadas las alteraciones que involucran los gonosomas, como sucede en los síndromes de Turner o de Klinefelter. Otros cuadros clínicos que se acompañan de ambigüedad de genitales pueden deberse a mosaicos o mixoploidías, como ocurre en la disgenesia gonadal mixta con cariotipo 45,X/46,XY. Otros se deben a mutaciones en el gen SRY o a su localización anormal en el cromosoma X, por un intercambio entre el cromosoma Y y el X durante la meiosis, como sucede en algunos casos de varones XX o de hermafroditismo verdadero.

Los avances en genética han permitido también el advenimiento de la citogenética molecular, mediante el desarrollo de sondas específicas o marcadores para cada uno de los cromosomas, lo que permite el diagnóstico de aberraciones cromosómicas en células en interfase, es decir, sin necesidad de recurrir al cultivo de las células *in vitro,* utilizando las técnicas de hibridización *in situ* que se conocen por sus siglas en inglés como FISH, como ya se mencionó previamente.

Un aporte significativo de estas metodologías ha sido el permitir la identificación de aberraciones cromosómicas estructurales que pasan desapercibidas incluso al análisis con técnicas de bandas de alta resolución. Tal es el caso de las translocaciones crípticas y de las deleciones submicroscópicas. Las translocaciones crípticas son rearreglos estructurales muy sutiles, responsables de malformaciones congénitas y retardo mental, que comprometen los extremos de los cromosomas, o sea sus porciones teloméricas. Se han descubierto, por ejemplo, en niños con hemoglobina H, malformaciones y retardo mental que muestran translocaciones no equilibradas en familias en las que alguno de los progenitores es el portador, o en pacientes con el síndrome de Miller-Dicker. Translocaciones crípticas también han sido descritas en pacientes con síndrome de “maullido de gato” y en pacientes con síndrome de Wolf-Hirschhorn.



Aspectos preventivos y terapéuticos

El reconocimiento de las mutaciones en los genes responsables de padecimientos mendelianos ha permitido proporcionar un asesoramiento genético

más adecuado al ser factible la identificación de los sujetos portadores o heterocigotos, en el caso de los padecimientos recesivos, o de las mujeres portadoras en el caso de los padecimientos ligados al cromosoma X, como la distrofia muscular de Duchenne, la hemofilia, el síndrome de Lesch-Nyhan o el del cromosoma X frágil.

Otro avance notable lo constituye el poder realizar con precisión el diagnóstico prenatal *in utero* de los afectados en aquellas parejas con alto riesgo genético. Esto es particularmente importante en los padecimientos recesivos ligados al X, ya que el hijo varón de una mujer portadora tiene un riesgo de afección de 50%. Por este riesgo, inicialmente sólo se hacía el diagnóstico del sexo del producto y, si era varón, las parejas decidían la interrupción del embarazo, lo que tiene notables implicaciones éticas, ya que podía interrumpirse el embarazo de un producto que tenía 50% de probabilidades de ser normal.

Estas limitaciones de naturaleza ética han sido superadas gracias a los avances de la genética molecular aplicados a la prevención de los padecimientos hereditarios.

El otro aspecto relevante que permite estos logros es el desarrollo de terapias racionales para los trastornos genéticos. En este campo, los avances han sido espectaculares. Ya ha sido posible manipular el gen para la resistencia a la neomicina en células hematopoyéticas del ratón adulto, así como el gen de la hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa, cuya deficiencia causa el síndrome de Lesch-Nyhan. Manipulaciones similares se han llevado a cabo en la deficiencia de adenosina-deaminasa que produce defectos en la respuesta inmune y que afecta solamente a las células de la médula ósea, por lo que las células tratadas *in vitro* pueden ser reimplantadas. Asimismo, se han obtenido numerosas cepas de animales transgénicos que han respondido a manipulaciones terapéuticas. Así, por ejemplo, la inyección de los genes de la hormona de crecimiento de la rata en huevos fertilizados de ratón y del gen de la hemoglobina humana en ratones talasémicos, han demostrado respuestas espectaculares. Por otra parte, en el ratón hipogonadal, que es genéticamente estéril, se pudieron establecer las funciones reproductivas introduciendo el gen de la hormona liberadora de la gonadotropina ausente en estos animales.

Más recientemente se han probado con éxito manipulaciones terapéuticas en padecimientos tan importantes como la fibrosis quística y la distrofia muscular de Duchenne. En el caso de la fibrosis quística se ha establecido que el producto génico es una proteína de membrana que al mutar altera el transporte de cloro. Se ha incorporado el gen normal a distintos vectores y mediante nebulizaciones se introduce *in vivo* a las células epiteliales del árbol bronquial, ya que el adenovirus tiene trofismo especial por este epitelio. En la distrofia muscular se ha manipulado con éxito el gen de la distrofina.

Existen en la actualidad numerosos protocolos de investigación clínica relacionados con la terapia génica aplicada a distintas neoplasias y son prometedores los avances relacionados con la terapia de células troncales en padecimientos gravemente limitantes como la enfermedad de Parkinson, la

enfermedad de Alzheimer, la enfermedad isquémica del miocardio y las lesiones traumáticas de la médula espinal.



Referencias bibliográficas

Altherr, M.R.; Bengtsson, U.; Elder, F.B. y cols., "Molecular confirmation of Wolf Hirschhorn syndrome with a subtle translocation of chromosome 4", *Am. J. Hum. Genet.,* **49:** 1235-1242, 1991.

Brown, M.D.; Voljavee, A.; Lott, M.T. y cols., "Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy", *Genetics,* **130:** 163-173, 1992.

Burke, C.; Carle, O. y Olson, S., "Yeast artificial chromosomes", *Science,* **236:** 806-812, 1987.

Cann, R.L., "In search of Eve", *The Sciences*, New York Acad. Sci., **5:** 30-36, 1987.

Collins, F.S., "Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications", *Science,* **256:** 774-779, 1992.

Constantini, F.; Chada, K. y Magram, J., "Correction of murine beta thalassemia by gene transfer into the germ line", *Science,* **233:** 1192-1194, 1986.

Corneo, G.; Gianelli, E. y Pollie, E., "Repeated sequences in human DNA", *J. Molec. Biol.,* **48:** 319-328, 1970.

Dunham, I. y cols., "The DNA sequence of human chromosome 22", *Nature,* **402:** 489-495, 1999.

Emery, A.E.H., *Duchenne Muscular Dystrophy*, Oxford Medical Publications, Oxford, 1993.

Fantes, J.A.; Bicmore, W.A.; Fletcher, J.M. y cols., "Submicroscopic deletions at the WAGR *locus* revealed by nonradioactive in situ hybridization", *Am. J. Hum. Genet.,* **51:** 1286-1294, 1992.

Giles, R.E.; Blanc, H.; Cann, H.M. y cols., "Maternal inheritance of human mitochondrial DNA", *Proc. Acad. Sci.,* EE.UU., **77:** 6715-6725, 1980.

Goto, Y.; Nonaka, I. y Horai, S., "A mutation in the tRNA Leu (UUR) gene associated with the Melas subgroup of mitochondrial encephalomiopathy", *Nature,* **348:** 651-653, 1990.

Hattori, M. y cols., "The DNA sequence of human chromosome 21", *Nature,* **405:** 311-319, 2000.

Kan, Y.W.; Dozzy, A.; Trecartin, R. y cols., "Identification of a non-deletion defect in alpha thalasemia", *New Engl. J. Med.,* **297:** 1081-1087, 1977.

Knewlton, R.G.; Cohen-Haguenauer, O.; Tsui, L.C. y cols., "A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located in chromosome 7", *Nature,* **318:** 380-382, 1985.

Koening, M.; Bertelson, C.J.; Monaco, A.P. y cols., "Complete cloning of the Duchenne Muscular Dystrophy and preliminary genomic organization of the gene in normal and affected individuals", *Cell,* **50:** 509-516, 1987.

Kuwano, A.; Ledbetter, S.A.; Dobyns, W.B. y cols., "Detection of deletions and cryptic translocations in Miller-Dieker syndrome by in situ hybridization", *Am. J. Hum. Genet.,* **49:** 707-714, 1991.

Lam, J.; Harris, P.C.; Lindenbaum, R.H. y cols., "Detection of break points in submicroscopic chromosomal translocation, illustrating an important mechanism for genetic disease", *Lancet,* **2:** 819-824, 1989.

Lander, E.S. y cols., "Initial sequencing and analysis of the human genome" *Nature*, **409:** 860-921, 2001.

Ledbetter, D.H., "Cryptic translocations and telomere integrity", *Am. J. Hum. Genet.,* **51:** 451-456, 1992.

Mason, A.J.; Pitts, S.L.; Wikolicks, K. y cols., "The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy", *Science,* **234:** 1372-1374, 1986.

McKusick, V.A., *Mendelian inheritance in man,* The John Hopkins University Press, Baltimore, 1992.

Miller, A.D.; Eckner, R.J.; Jolly, J.D. y cols., "Expression of a retrovirus encoding human HPGRT in mice", *Science,* **223:** 630-633, 1984.

Mullis, K.B., "The unusual origin of the polymerase change reaction", *Scientific Amer.,* **262:** 43-46, 1990.

Myers, E.W. y cols., "A whole-genome assembley of Drosophila", *Science,* **287:** 2196-2204, 2000.

Nathans, D. y Smith, H.O., "Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules", *Ann. Rev. Biochem.,* **44:** 273-296, 1975.

Overhauser, J.; Bengtsson, U.; McMahon, J. y cols., "Prenatal diagnosis and carrier detection of a cryptic translocation by using DNA markers from the short arm of chromosome 5", *Am. J. Hum. Genet.,* **45:** 296-303, 1989.

Palmiter, R.D.; Brinster, R.L.; Hammer, R.E. y cols., "Dramatic growth of mice that develop X microinjected with metalothione in growth hormone fusion genes", *Nature,* **300:** 611-615, 1982.

Pinkel, D.; Landegent, J.; Collins, C. y cols., "Fluorescence in situ hybridization with human chromosome specific libraries. Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **85:** 9138-9142, 1988.

Poulton, J.; Deadman, M.E. y Gardiner, M.R., "Duplications of mitochondrial DNA in mitochondrial miopathy", *Lancet,* **1:** 236-240, 1989.

Salamanca, F., "Nuevas fronteras de la genética humana y sus implicaciones. Diagnóstico prenatal y terapéutica in utero", *Gac. Méd. Méx.,* **122:** 126-129, 1986.

———— , "Asesoramiento genético", en *Introducción a la Pediatría,* Palacios, J. y Gámes, J., eds., Méndez Oteo, México, D.F., 875-895, 1988.

———— , "Citogénica humana", *Fundamentos y aplicaciones clínicas,* Editorial Médica Panamericana, México, D.F., 1990.

Schmid, C.W. y Jelinek, W.R., "The Alu family of dispersed repetitive sequences", *Science,* **216:** 1065-1068, 1982.

Scott, A.; Philips, J. y Migeon, B., "DNA restriction endonuclease analysis for localization of human beta and delta globin genes on chromosome 11", *Proc. Natl. Acad. Sci.,* EE.UU., **76:** 4563-4569, 1979.

Sinclair, A.H.; Berta, P.; Palmer, M.S. y cols., "A gene of the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif", *Nature,* **346:** 240-244, 1990.

Stephens, J.C.; Cavanaugh, M.I.; Gradie, M.I. y cols., "Mapping the human genomic. Current Status", *Science,* **250:** 237-244, 1990.

Venter, J.C. y cols., "The sequence of the human genome", *Science,* **291:** 1304-1351, 2001.

Wallace, D.C.; Zheng, X.; Lott, M.T. y cols., "Familial mitochondrial encephalomiopathy (MERRF). Genetic, pathophysiological and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease", *Cell,* **55:** 601-610, 1988.

Watson, J.D. y Crick, F.H.C., "Molecular structure of nucleic acids. A structure for the oxiribose nucleic acids", *Nature,* **171:** 737, 1953.

Wells, D.J.; Wells, K.E.; Walsh, F.S. y cols., "Human dystrophin expression corrects the myopathic phenotype in transgenic mdx mice", *Hum. Mol. Gen.,* **1:** 35-40, 1992.

Williams, D.A.; Lemischka, I.R.; Nathan, D.G. y cols., "Introduction of new genetic material into pluripotent hematopoyetic stem cells of the mouse", *Nature,* **310:** 476-478, 1984.

ÍNDICE

B

D

F

N

O

P

Q

R

U

V

W

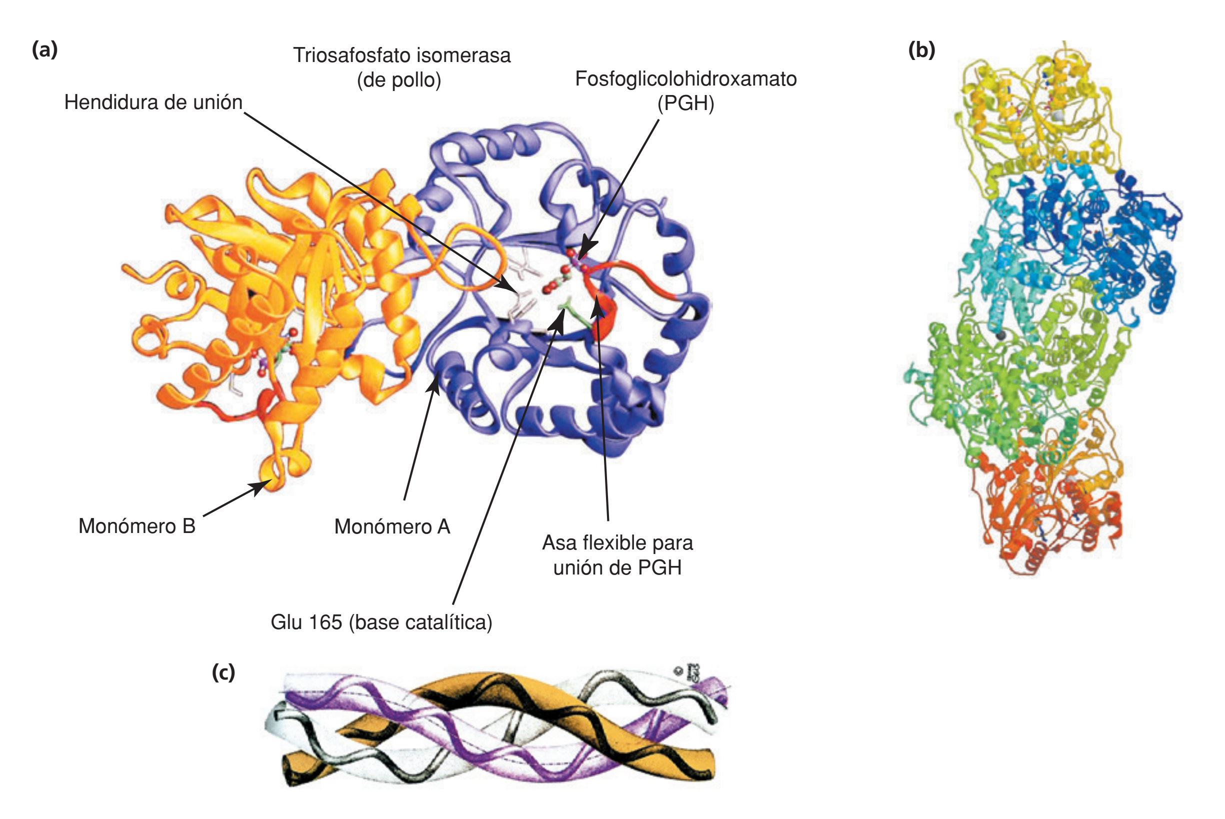


Figura 3-1. a) Triosafosfato isomerasa de pollo. **b)** Nitrogenasa. **c)** Colágena.

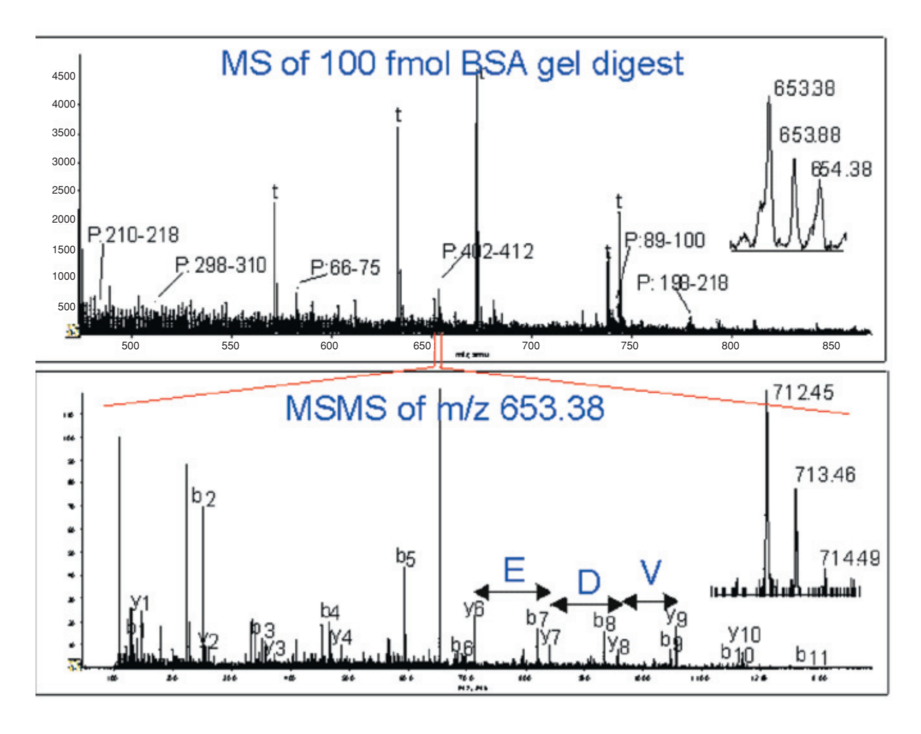


Figura 3-3. Resultado de un experimento de espectrometría de masas en tándem, donde se revela un segmento de secuencia, mediante el análisis sucesivo (tándem) de especies peptídicas separadas por su peso molecular.

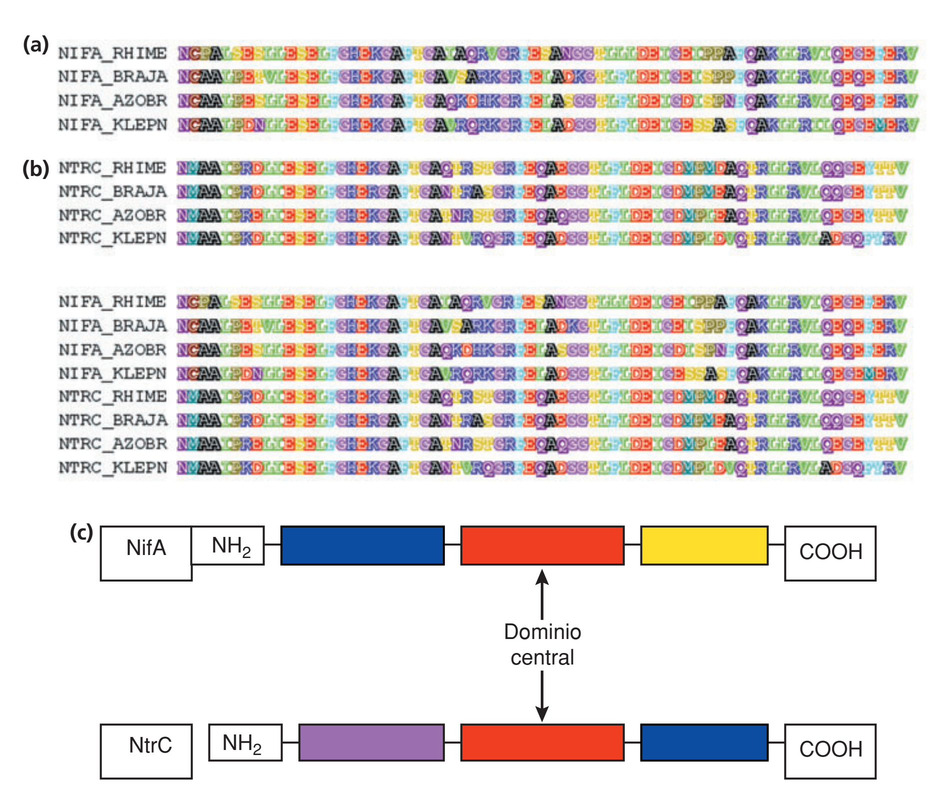


Figura 3-4. a) Alineamiento de las proteínas NifA. **b)** Alineamiento de las proteínas NtrC y de las proteínas NifA con NtrC. **c)** Organización de los dominios estructurales de NifA y NtrC. Solamente el dominio central es homólogo.

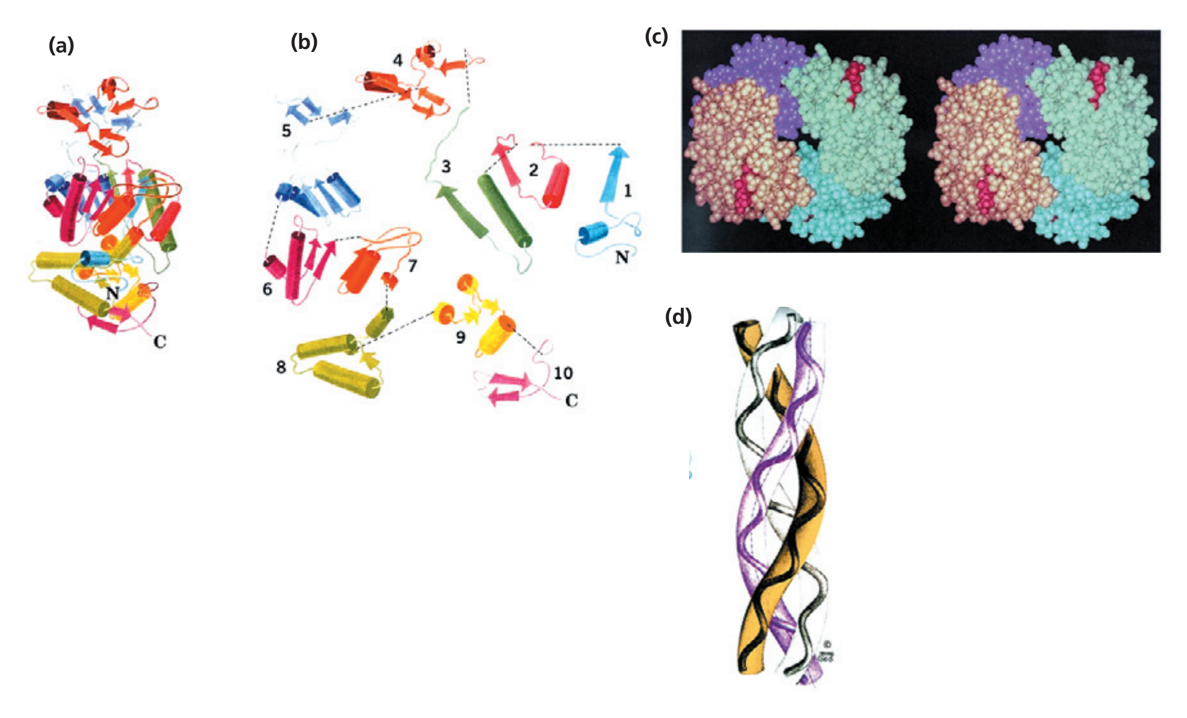


Figura 3-5. a), b), c) y **d).** Collage de subestructuras de una proteína y ejemplo de una estructura cuaternaria y estructura de una proteína fibrosa.

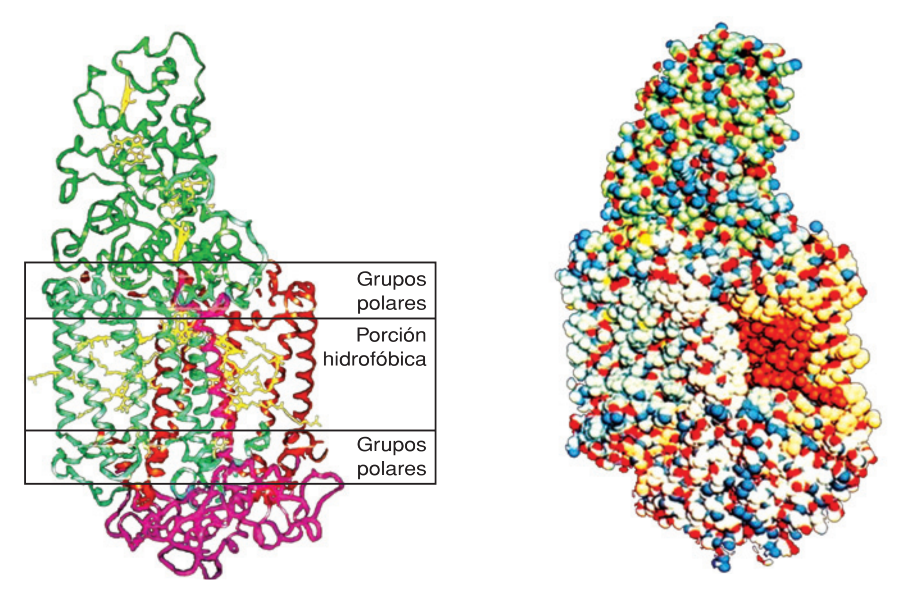


Figura 3-6. Centro reactivo fotosintético (proteína membranal).

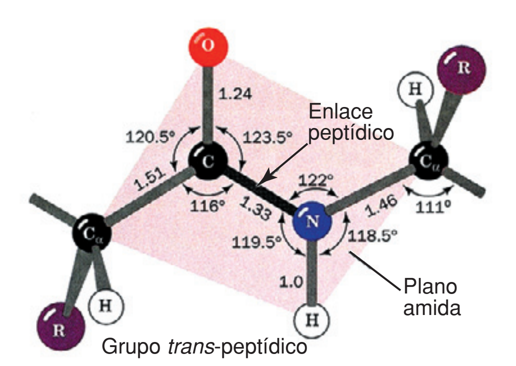


Figura 3-7. Enlaces peptídicos *trans*.

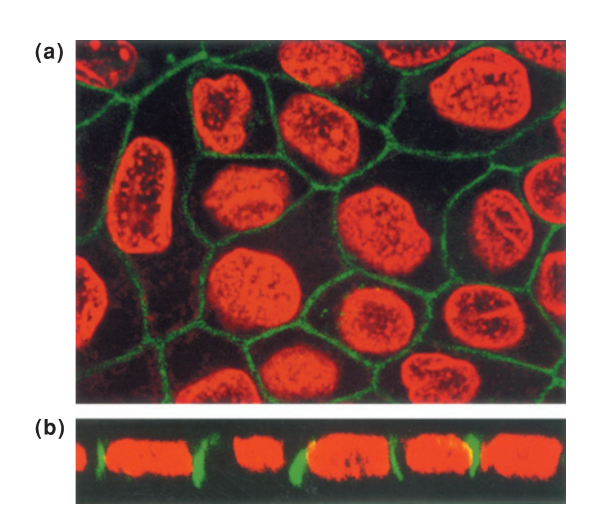


Figura 6-21. La distribución basolateral de la Na^+, K^+-ATPasa en células MDCK. Imágenes de inmunofluorescencia obtenidas por microscopia confocal de células MDCK derivadas de riñón de perro. Las células se trataron con un primer anticuerpo contra la subunidad-β de la Na^+, K^+-ATPasa y con un segundo anticuerpo conjugado a fluoresceína (FITC). El color verde indica la subunidad-β de la Na^+, K^+-ATPasa y las estructuras rojas son los núcleos que fueron teñidos con yoduro de propidio. En **a)** se observa el patrón de distribución lateral, en un corte horizontal, y en **b)** en un corte vertical.

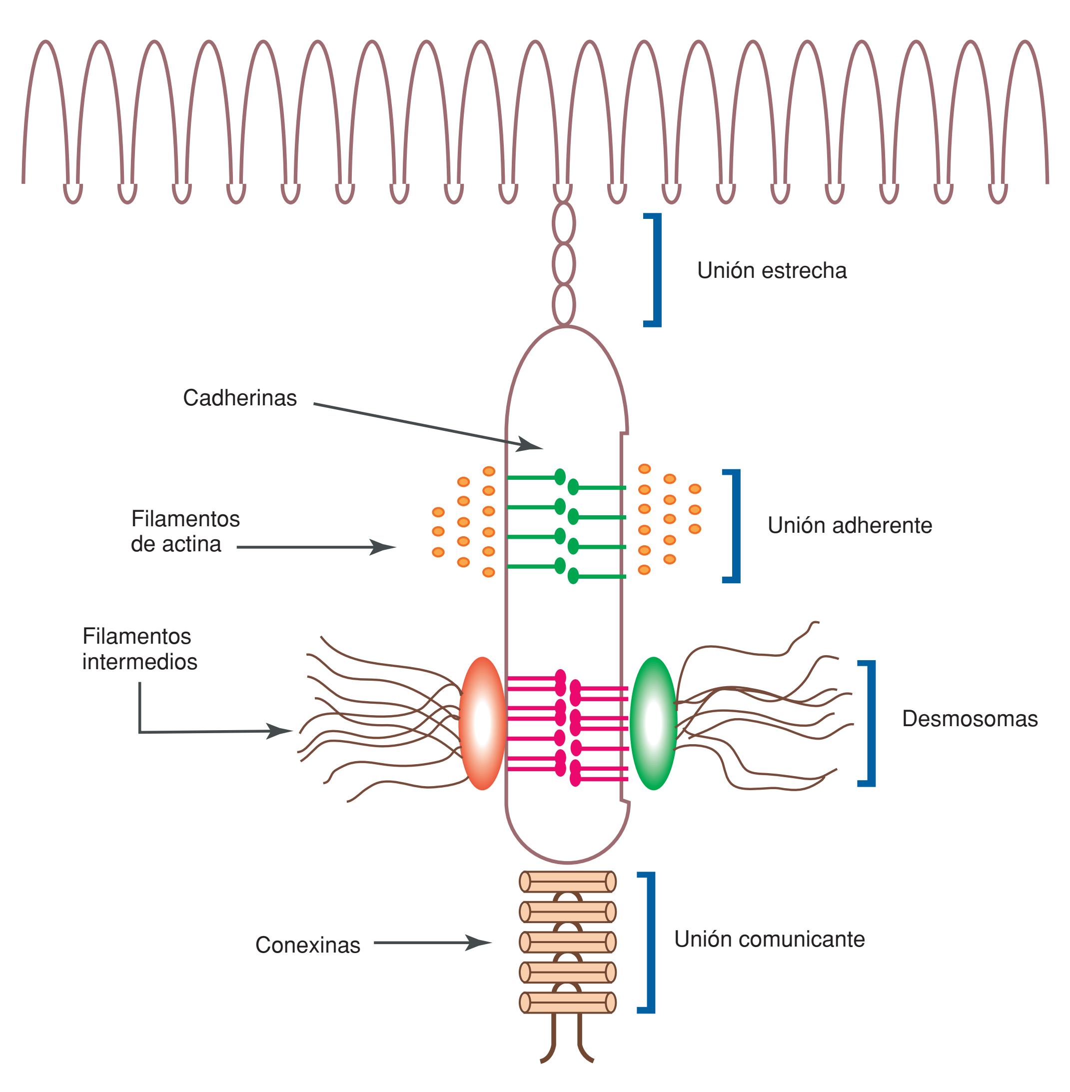


Figura 8-1. Representación esquemática del complejo de unión intercelular.

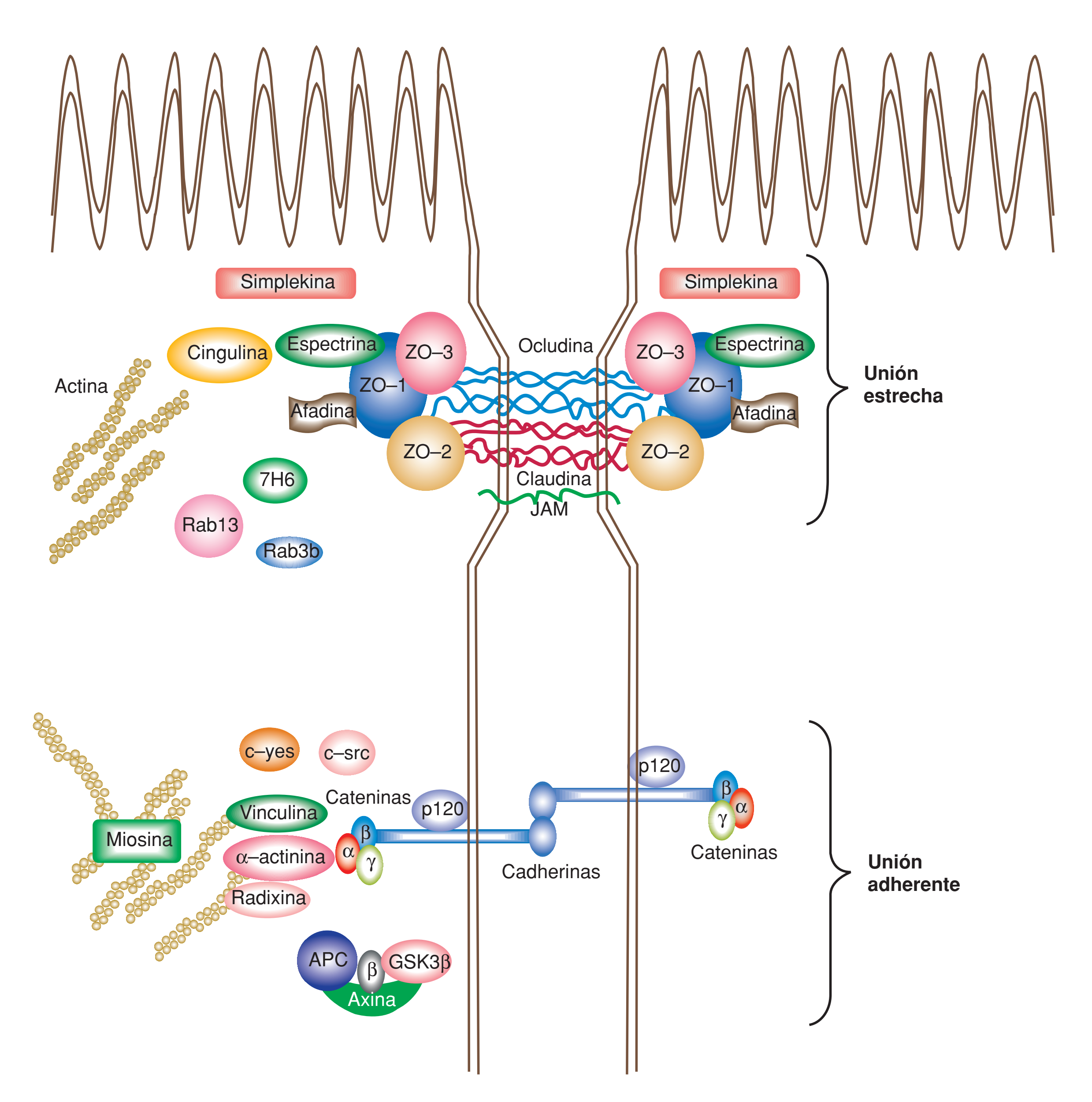


Figura 8-3. Representación esquemática de las proteínas de la unión estrecha y adherente.

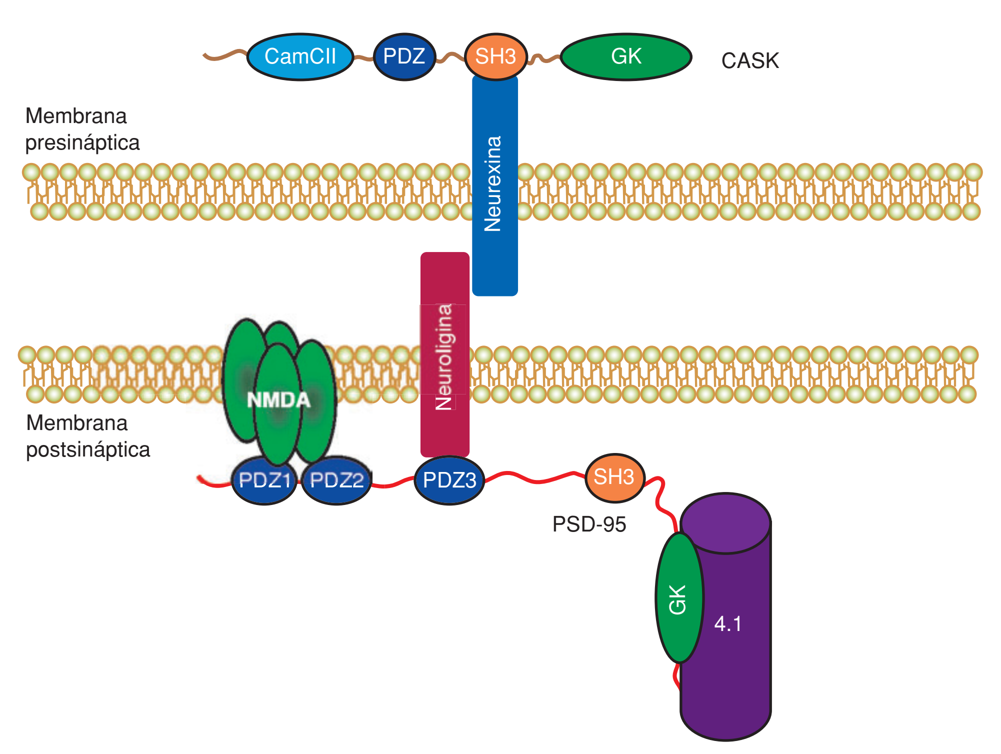


Figura 8-5. Las MAGUKs PSD-95 y CASK se localizan en las sinapsis y se asocian a canales y proteínas transmembranales. CASK se localiza en la región submembranal presináptica donde se asocia con la neurexina. Esta se une de forma heterofílica a la neuroligina de la membrana postsináptica. En la región submembranal de la membrana postsináptica se encuentra la PSD-95 que a través de sus repetidos PDZ une tanto al receptor a NMDA como a la neuroligina.

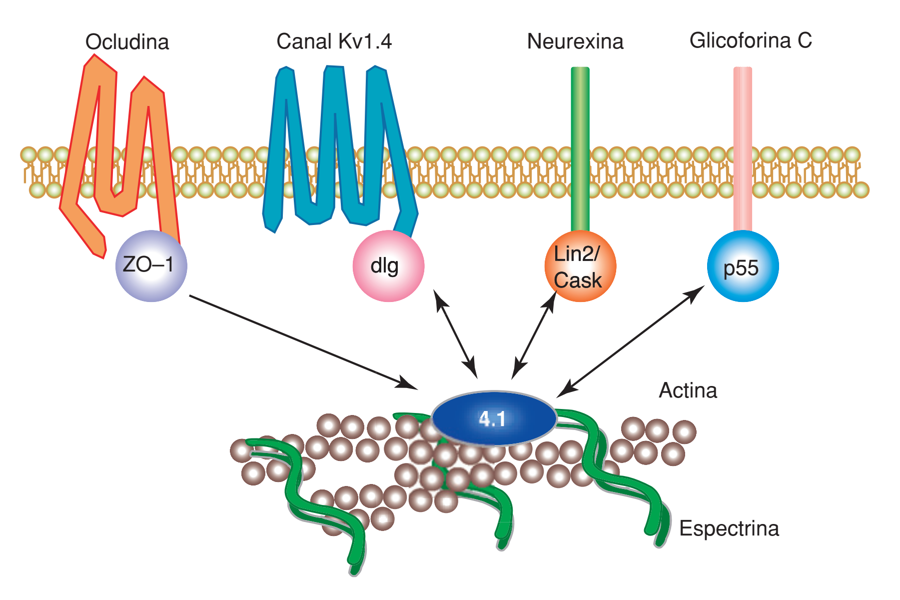


Figura 8-6. Modelo de la asociación existente entre diferentes proteínas transmembranales, las proteínas MAGUK y el citoesqueleto.

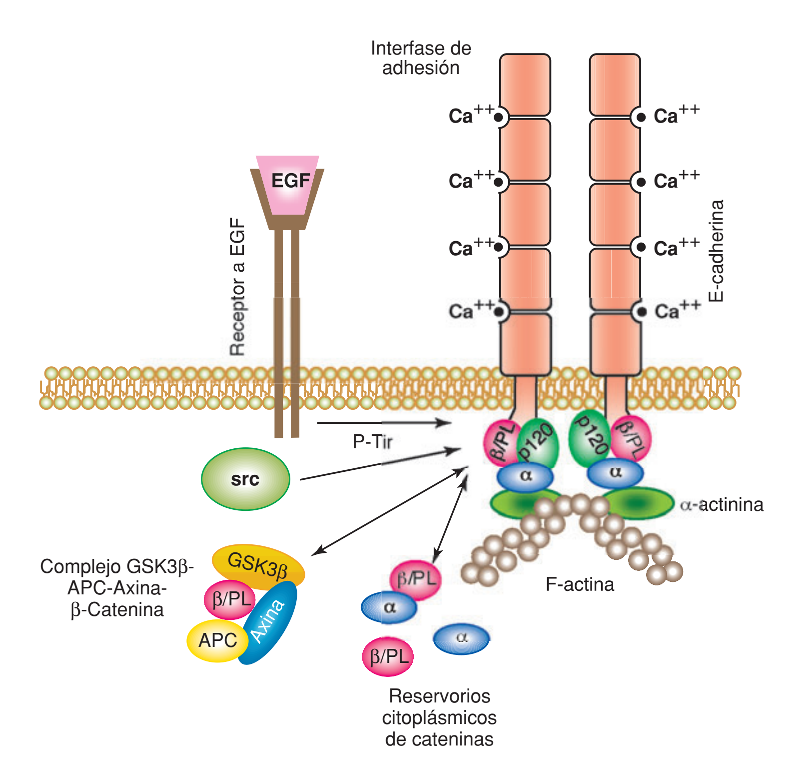


Figura 8-11. Esquema que ilustra la interacción entre la E-cadherina, las cateninas, el citoesqueleto y el receptor a factor de crecimiento epitelial. EGF = factor de crecimiento epitelial; α = α-catenina; β/PL = β-catenina o plakoblobina; p120 = CAS.

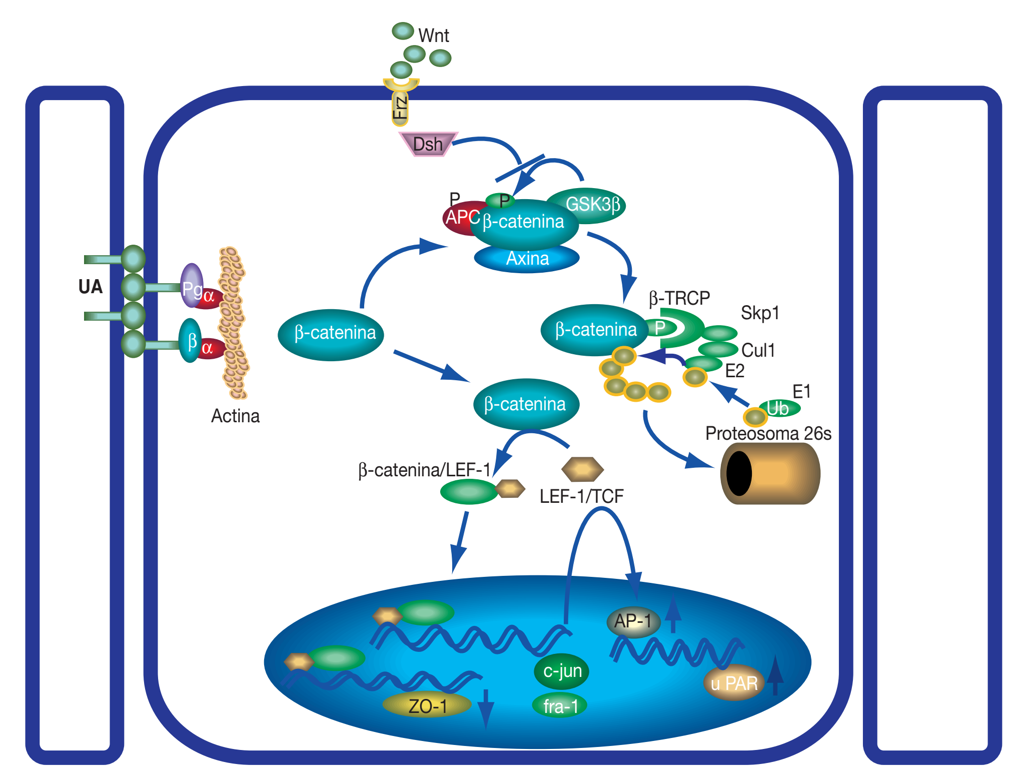


Figura 8-13. Ruta wingless de transducción de señales. Cuando se activa la ruta Wingless, la proteína Wnt se asocia a su receptor frizzled (Frz). En seguida la proteína dishevelled (Dsh) bloquea la fosforilación de la β-catenina por la GSK3β. La β-catenina no fosforilada se asocia en el citoplasma al factor de transcripción LEF-1/TCF y viaja al núcleo donde regula la expresión de ZO-1, del factor de transcripción AP-1 y de la metaloproteinasa uPAR. Cuando la ruta Wingless esta inactiva, la GSK3β fosforila a la β-catenina y a APC. La β-catenina fosforilada es ubiquitinada y posteriormente degradada en el protesosoma.

Actina

Adhesión
célula-célula

P

PTP

β-cat

N. cadherina

α-actinina

α-cat

Desfosforilación
de β–catenina

Fosforilación de PTP

Desfosforilación de PTP

Fosforilación de β–catenina

PTP

Pérdida de la adhesión
célula-célula

α-cat

N. cadherina

P

α-actinina

β-cat

Figura 8-14. Diagrama que ilustra los efectos de la fosforilación de la fosfatasa PTP1B y de la β-catenina sobre la adhesión intercelular. La fosforilación de la fosfatasa PTP1B regula su asociación con la N-cadherina y la fosforilación en residuos de tirosina de la β-catenina controla la estabilidad del complejo cadherina-cateninas.

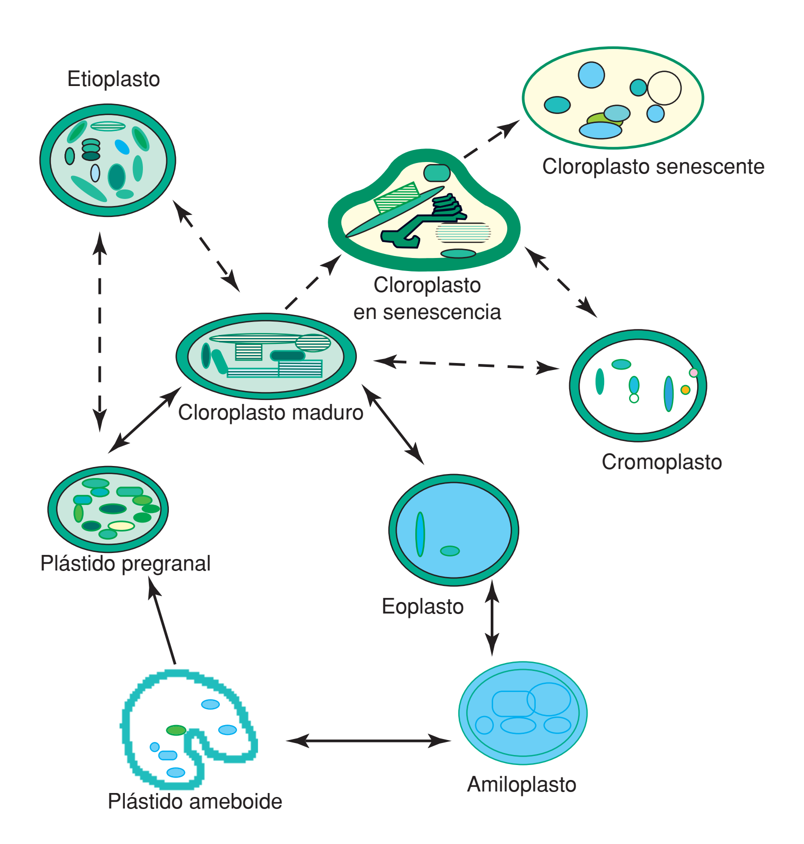


Figura 11-2. Ciclo del desarrollo de cloroplastos, propuesto por Whatley en 1978. Los diferentes plástidos provienen de un plástido no diferenciado denominado proplástido o eoplasto. Las flechas indican que los diferentes plástidos pueden interconvertirse entre sí, dependiendo de las condiciones externas.

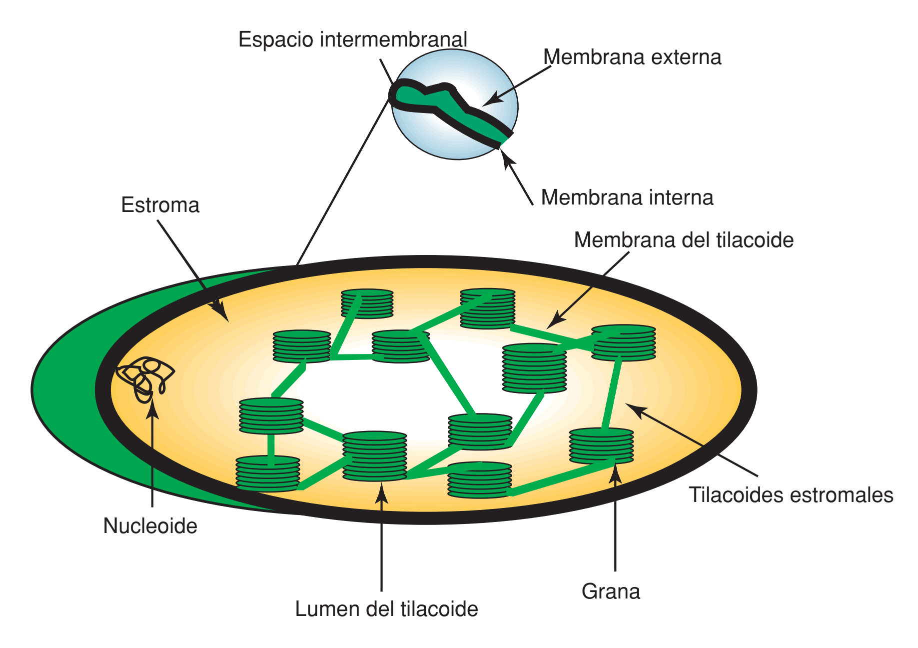
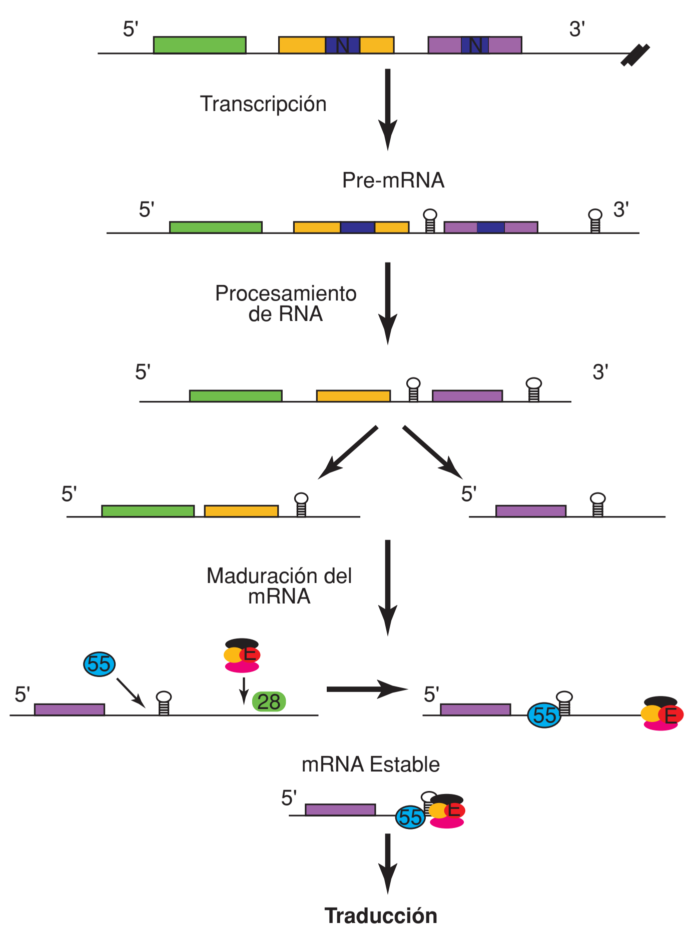


Figura 11-3. Compartimentos subcelulares del cloroplasto. El cloroplasto está formado por tres compartimentos membranales; membrana externa, interna y tilacoidea, y por dos compartimentos solubles, estroma y lumen del tilacoide. En el estroma se encuentran las proteínas de transcripción, replicación y duplicación, así como el DNA del organelo; el nucleoide.



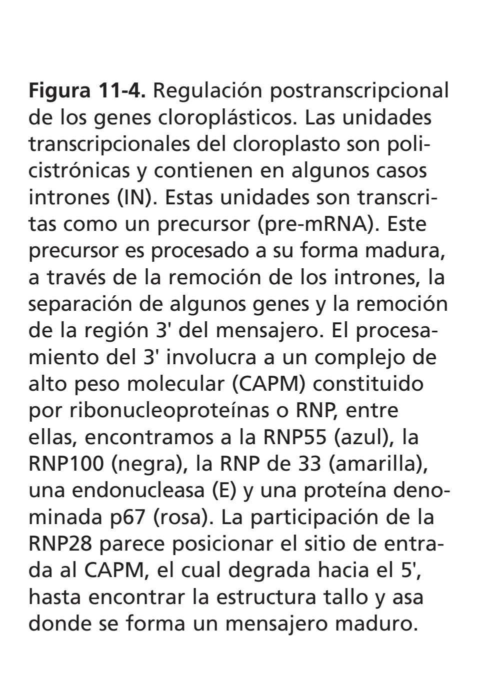


Figura 11-4. Regulación postranscripcional de los genes cloroplásticos. Las unidades transcripcionales del cloroplasto son policistrónicas y contienen en algunos casos intrones (IN). Estas unidades son transcritas como un precursor (pre-mRNA). Este precursor es procesado a su forma madura, a través de la remoción de los intrones, la separación de algunos genes y la remoción de la región 3' del mensajero. El procesamiento del 3' involucra a un complejo de alto peso molecular (CAPM) constituido por ribonucleoproteínas o RNP, entre ellas, encontramos a la RNP55 (azul), la RNP100 (negra), la RNP de 33 (amarilla), una endonucleasa (E) y una proteína denominada p67 (rosa). La participación de la RNP28 parece posicionar el sitio de entrada al CAPM, el cual degrada hacia el 5', hasta encontrar la estructura tallo y asa donde se forma un mensajero maduro.

Proteína precursora

Citoplasma

ATP + GTP

ADP + GDP + 2Pi

Membrana externa

Com70

34

75

86

HSP70

Membrana interna

Péptido de tránsito

34 44 100

Figura 11-5. Modelo del importe de proteínas a través de la cubierta (membranas externa e interna) del cloroplasto. Las proteínas citosólicas son producidas como un péptido precursor que se une a un complejo proteico de la membrana externa. Esta unión depende de ATP. El complejo proteico esta formado por varias proteínas de diferente peso molecular. Después de la unión, el péptido es transportado a través de las dos membranas, posiblemente, a través de un poro formado por proteínas de ambas membranas. Durante el paso del péptido, la señal de tránsito al cloroplasto es removida por una proteasa específica que se encuentra en el estroma.

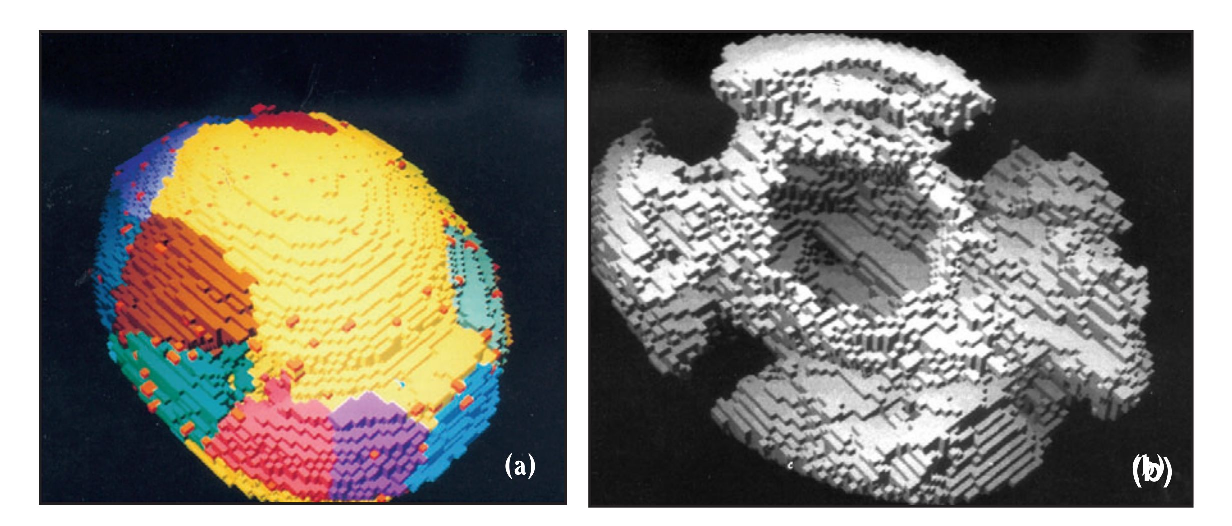


Figura 12-7. Reconstrucciones tridimensionales ayudadas por computadora a partir de micrografías electrónicas de cortes seriados teñidos con la técnica del PTA para cromatina. **a)** Aspecto externo en el que se ven las regiones en las que diferentes grumos de cromatina compacta se unen a la envoltura nuclear. Cada tono de gris representa el área de contacto de un grumo diferente. El tono más claro corresponde al cúmulo mayor, que es el que contiene al nucleolo. **b)** Corte del cúmulo de cromatina compacta que contiene al nucleolo (orificio central) mostrando 4 regiones de contacto con la envoltura nuclear.

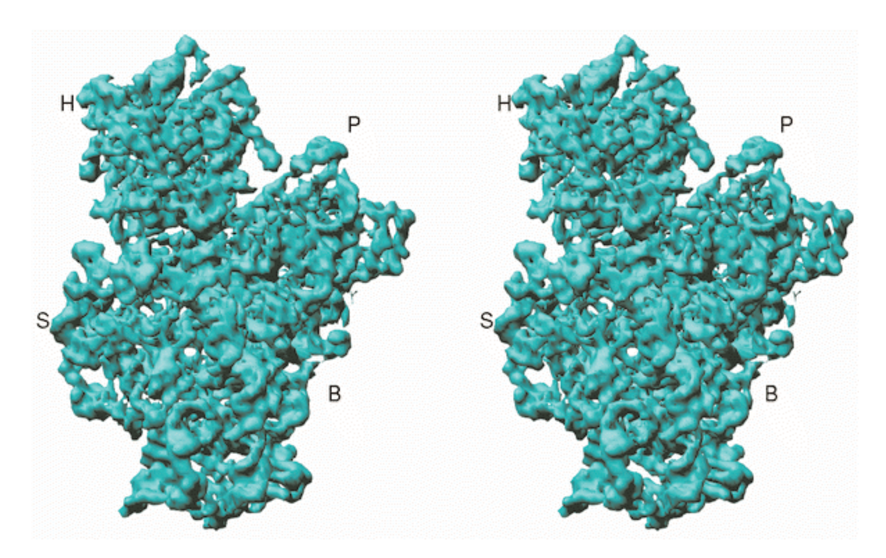


Figura 13-2. Mapa de densidad electrónica de la subunidad 30S a una resolución de 5.5 Å. Vista de la subunidad 30S por el frente y por atrás. Las regiones importantes están indicadas como H (cabeza), P (plataforma), S (hombro), y B (base).
Tomado de: Clemons y cols., 1999.

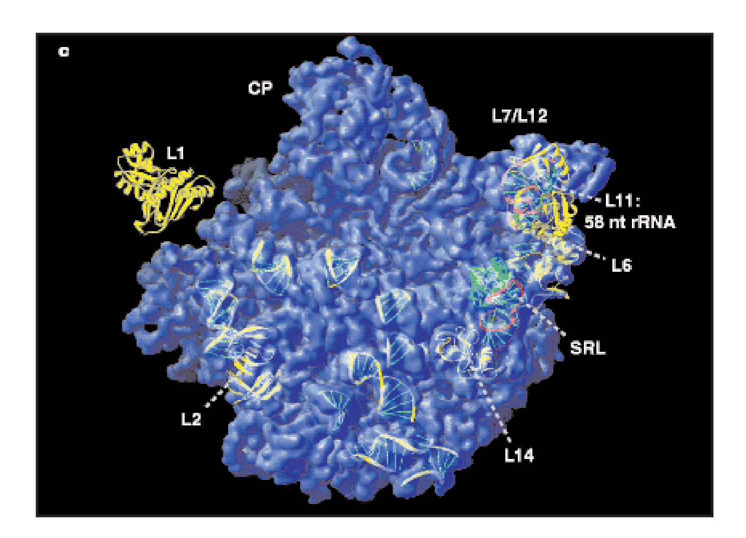


Figura 13-3. Mapa de densidad electrónica de la subunidad 50S a una resolución de 5 Å. Subunidad 50S vista de frente. Las letras L numeradas indican la posición de las proteínas ribosomales correspondientes. SRL corresponde a un asa de RNA (*sarcin-ricin loop*). Hacia el lado derecho está la zona del pentámero formado por las proteínas L-10 (no visible) y L7/L12.
Tomado de: Ban y cols., 1999.

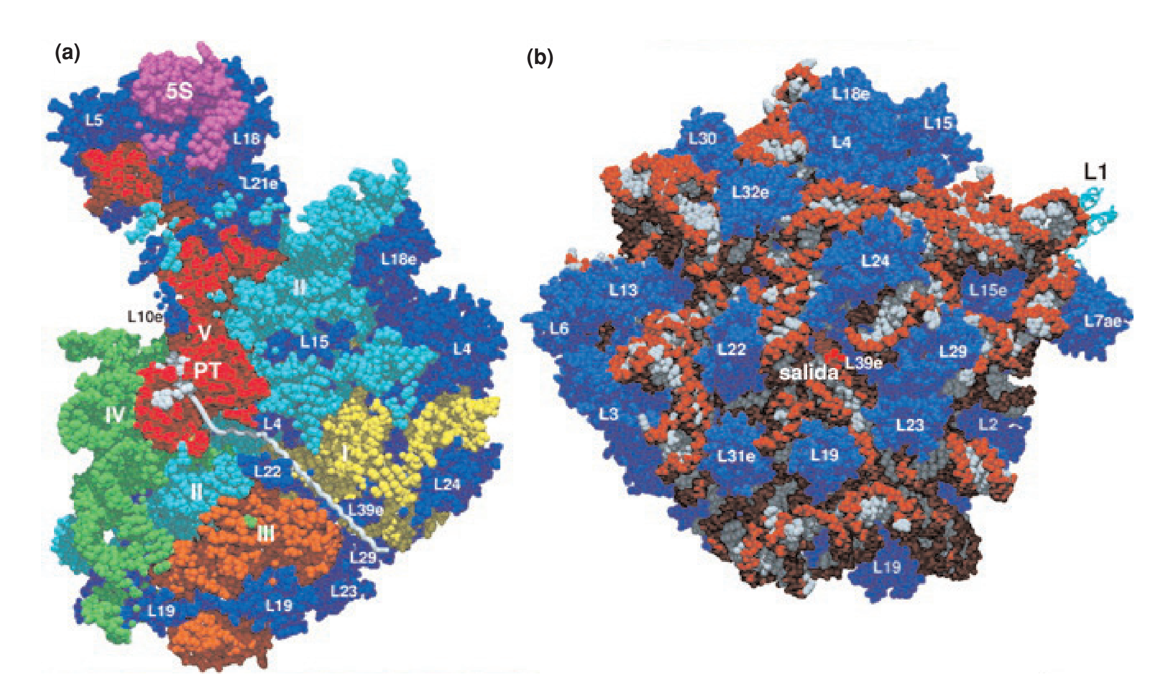


Figura 13-4. Centro de la peptidil transferasa y túnel de salida del péptido naciente.
a) Representación de un corte lateral de la subunidad 50S en un modelo que muestra el esqueleto de los átomos del RNA y las proteínas. Se observa la trayectoria del túnel (cordón blanco) que corre del centro de la peptidil transferasa (PT) al sitio de salida del péptido naciente (*salida*), en la parte posterior de la subunidad.
b) Vista de la parte basal de la subunidad 50S que muestra la posición de las proteínas ribosomales de esa área y, en la parte central, la salida del túnel (*salida*) por donde se desplaza el péptido naciente.
En ambas representaciones se ubica la posición de las proteínas que conforman a la subunidad 50S. Algunas de ellas (L4 y L22) parecen tener un papel importante en el tránsito del péptido naciente y su salida hacia el exterior.
Tomado de: Nissen y cols., 2000.

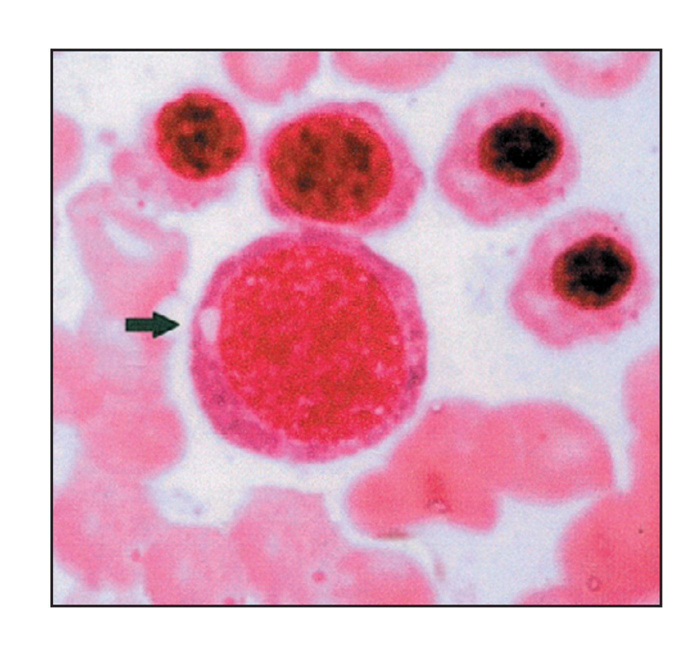


Figura 15-7. Impronta de médula ósea teñida mediante la técnica de Wright. Se pueden apreciar algunas de las células pertenecientes a las diferentes etapas de la maduración de la serie eritroide. Al centro, un proeritroblasto muestra la típica imagen negativa de Golgi (flecha). Este tipo celular experimentará múltiples divisiones celulares para formar un eritrocito maduro, por lo que es necesario la síntesis de grandes cantidades de membrana celular, la cual se lleva a cabo gracias a una de las diversas funciones que tiene uno de los organelos más importantes de la vía exocítica: el aparato de Golgi.

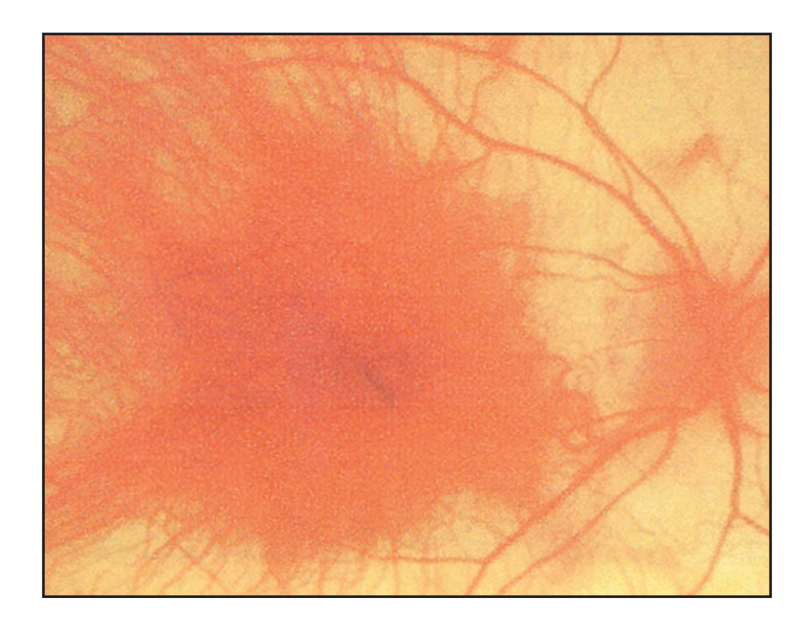


Figura 15-8. Estudio de fondo de ojo de un paciente con coroideremia avanzada. Nótese las graves alteraciones coriorretinianas en la región macular.

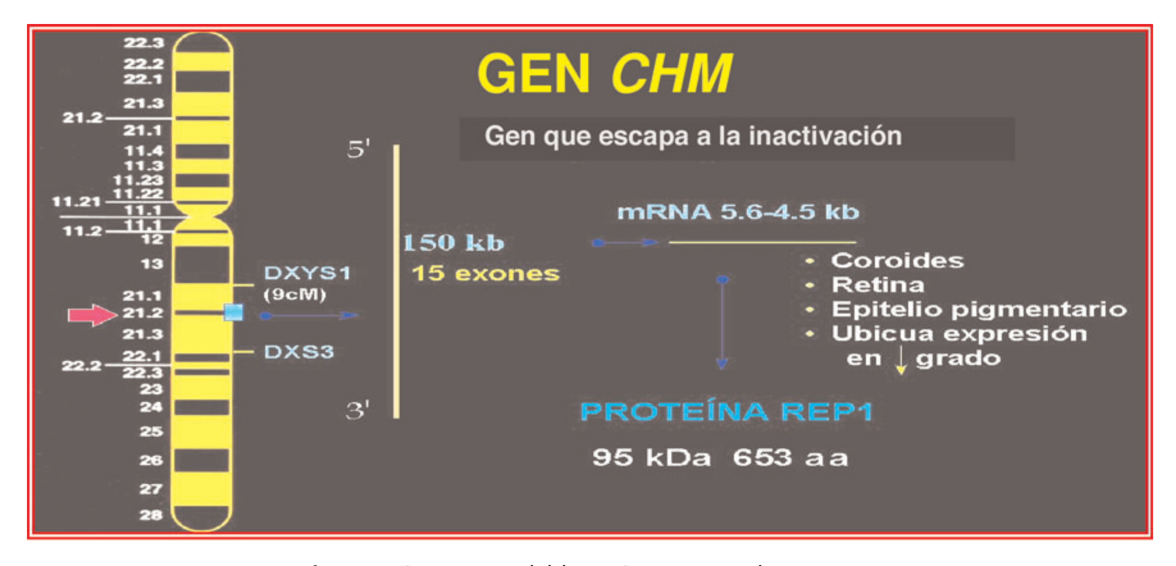


Figura 15-9. Esquema del *locus CHM* y su producto.

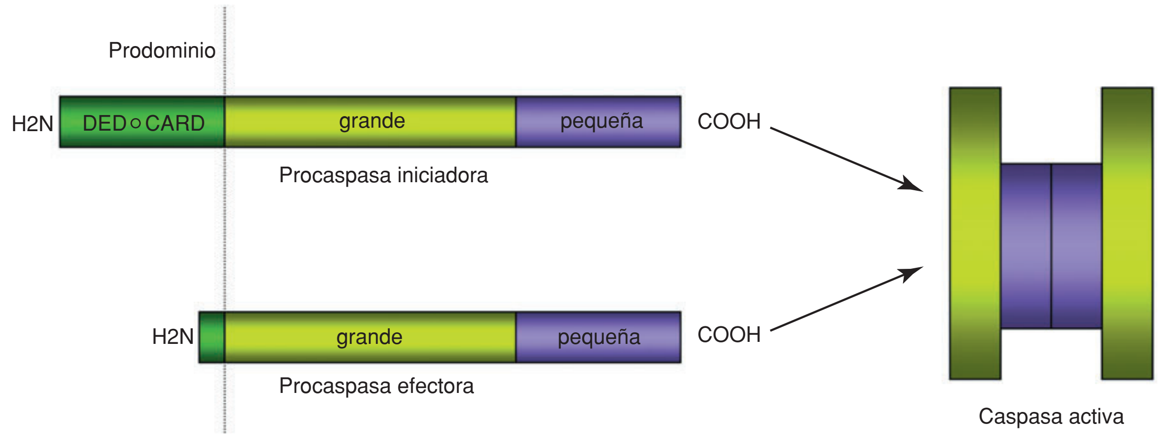


Figura 20-2. Dominios estructurales y procesamiento de las caspasas.

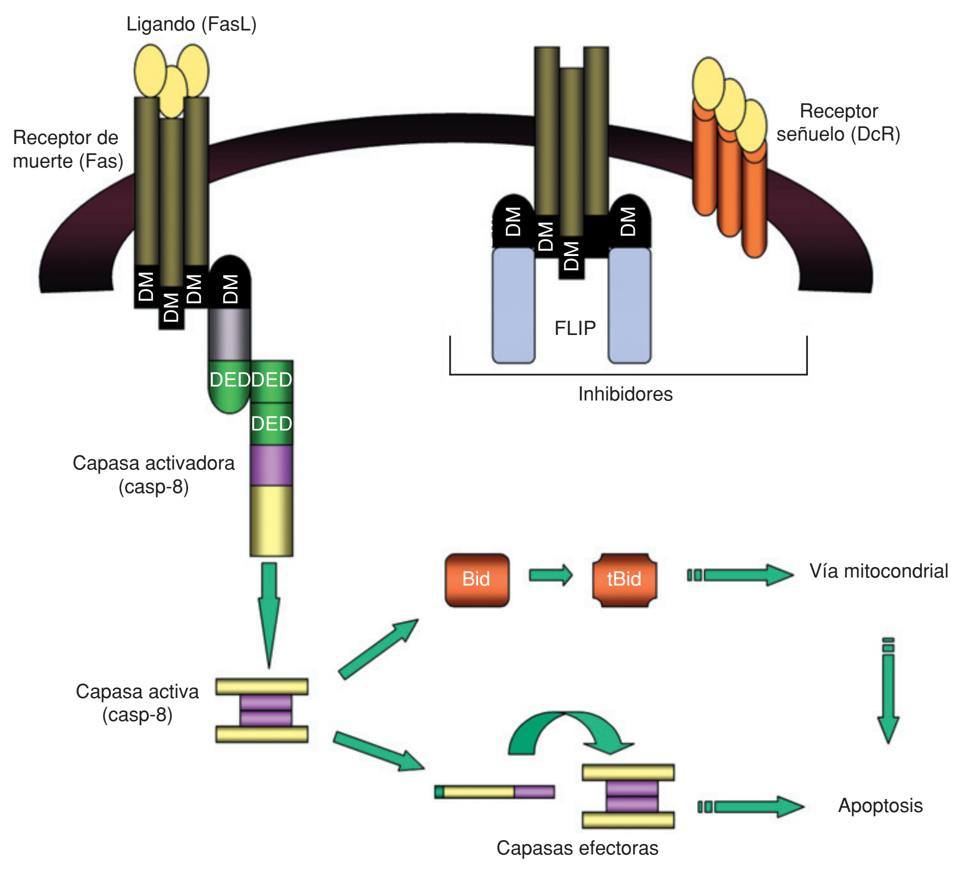


Figura 20-3. Activación de las caspasas por la vía extrínseca.

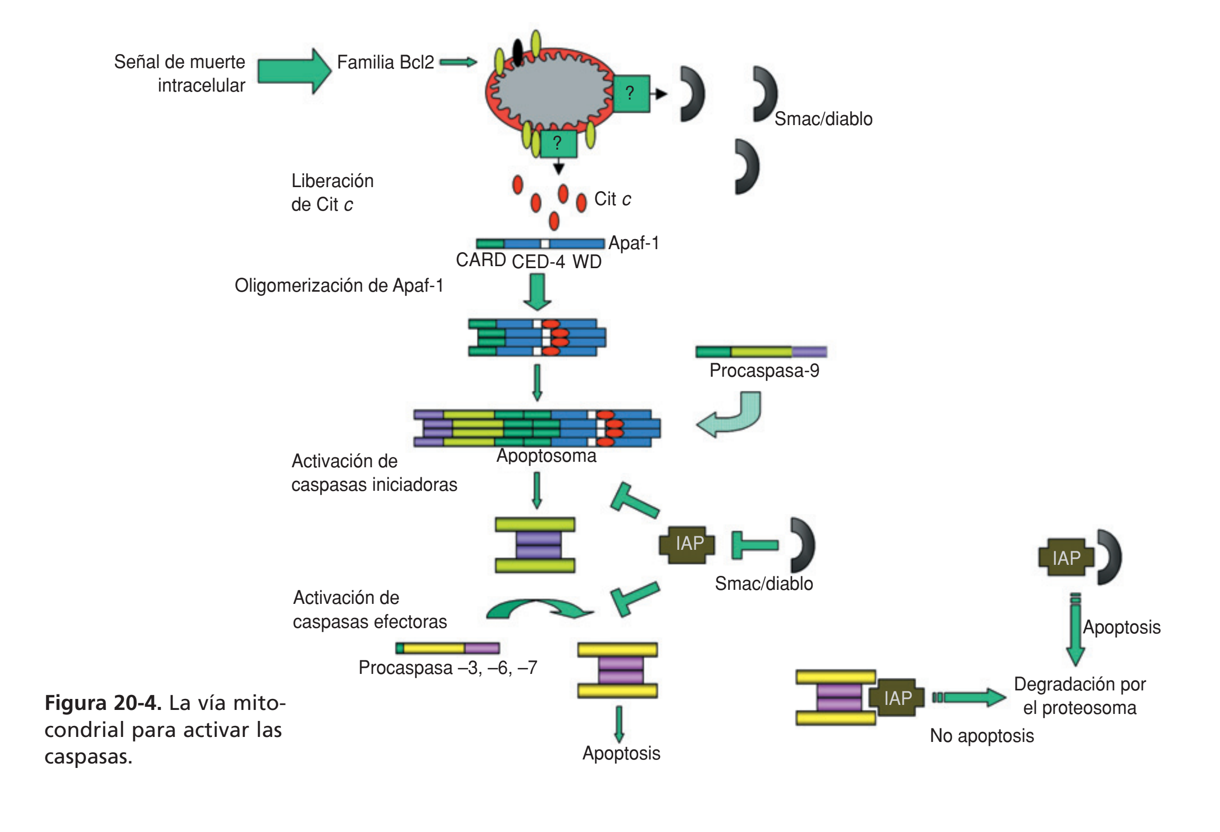


Figura 20-4. La vía mitocondrial para activar las caspasas.

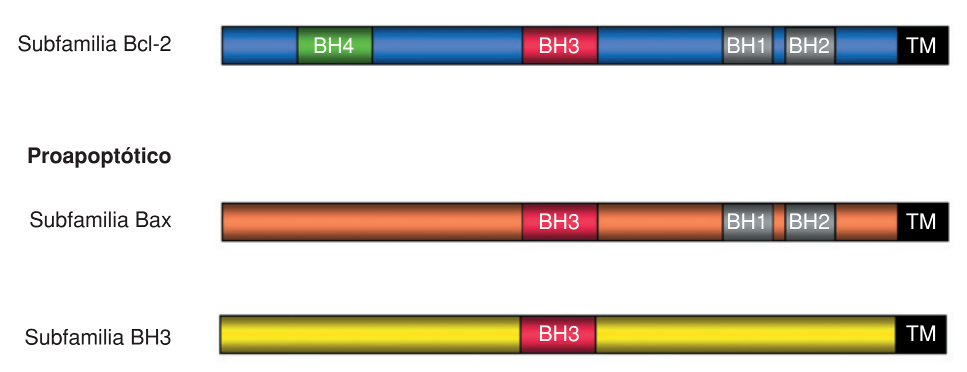


Figura 20-6. La familia de Bcl-2 se subdivide en tres subfamilias, de acuerdo con el contenido de dominios BH.

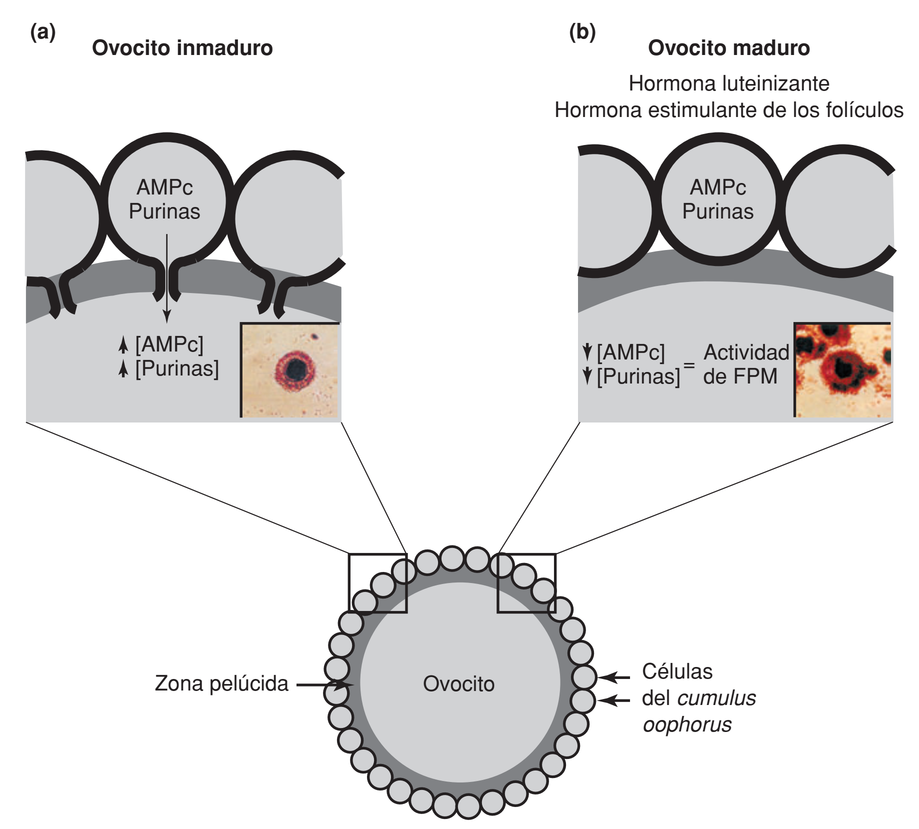


Figura 22-5. Aspecto de las uniones comunicantes entre el ovocito y las células del cúmulo en el proceso de maduración. **a)** Ovocito inmaduro con las uniones comunicantes intactas que permiten el paso de metabolitos entre ambas células. En el inserto se observa el *cumulus oophorus* muy compacto, característico de un ovocito inmaduro. **b)** Ovocito maduro, en el que las uniones se han roto por la dispersión de las células del cúmulo y se evita el paso de inhibidores de la maduración. En el inserto se observa el *cumulus oophorus* completamente expandido.

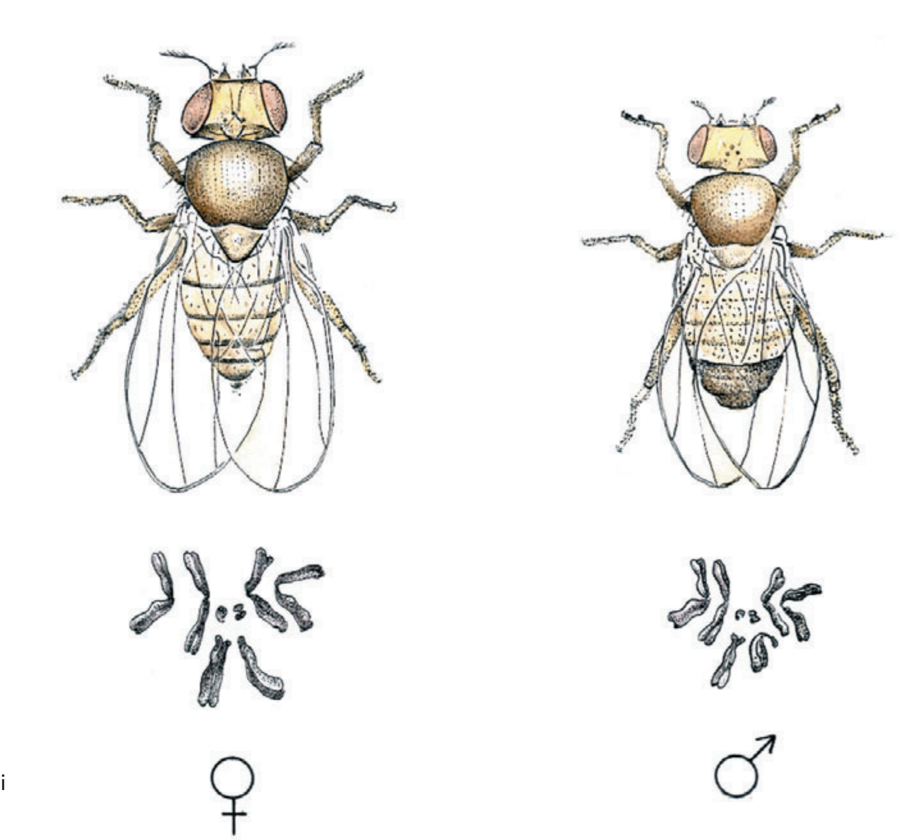


Figura 25-1. Esquema de la hembra/♀ y del macho/♂ de los cromosomas en metafase de *Drosophila melanogaster*. (Dibujo del Biól. Aldi de Oyarzábal.)

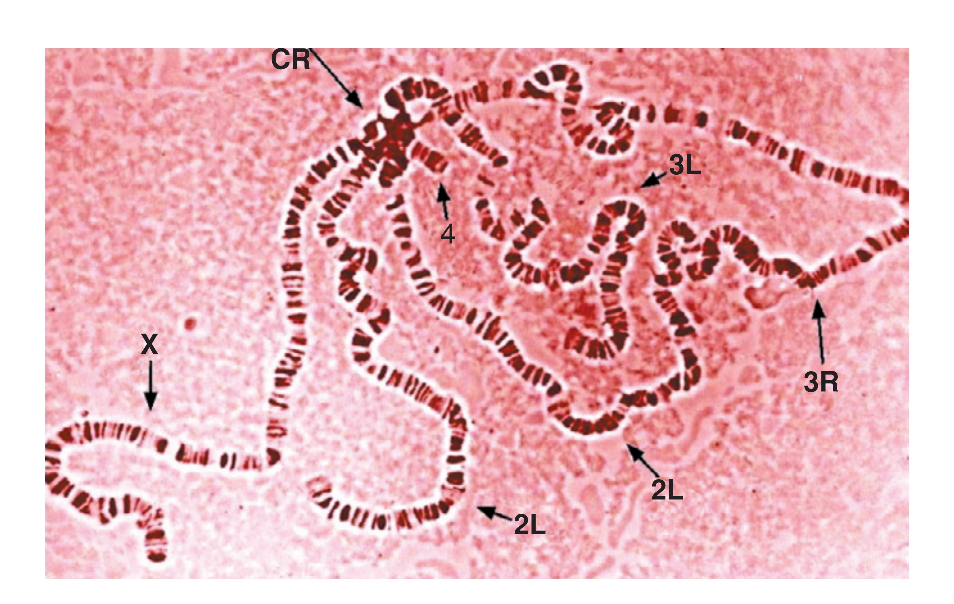


Figura 25-2. Esquema de los cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster*. X: cromosomas X con 983 bandas, 22.8 Mb, secciones 1-40; 2L: brazo izquierdo del cromosoma 2 con 874 bandas, 18.3 Mb, secciones 21-40; 2R: brazo derecho del cromosoma 3 con 1,063 bandas, 22.8 Mb, secciones 41-60; CR: cromocentro, 55 Mb, contiene los centrómeros y la heterocromatina constitutiva; 3L: brazo izquierdo del cromosoma 3 con 1,034 bandas, 21.2 Mb, secciones 61-80; 3R: brazo derecho del cromosoma 3 con 1,200 bandas, 24.1 Mb, secciones 81-100; 4: cromosoma 4 con 40 bandas, 1.3 Mb, secciones 101-102. Tomado de web.bro.utk.edu/general/sg0101/october4.hmtl.